



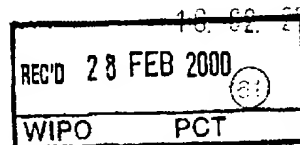
PCT/EP 00/00455  
Mod. C.E. - 1-4-7  
PCT/EP 00/00455

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

EPO - DG 1

4



INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. MI99 A 000210

— EP 00 / 455 —

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li .....

9 FEB 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE  
Ing. DI CARLO

*Carlo Di Carlo*



1498PTIT

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione SAICOM S.r.l.  
Residenza TRIESTE codice 00903040327  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.  
via C.so di Porta Vittoria n. 9 città Milano cap 20122 (prov) MI

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

classe proposta (sez./d./sd): G01N gruppo/sottogruppo 27

Biosensore amperometrico reattivo al pH.

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA DATA \_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) PIZZARIELLO ANDREA 3) STREDANSKA SILVIA  
2) STREDANSKY MIROSLAV 4) MIERTUS STANISLAV

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/A	SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo
1) <u>NESSUNA</u>					
2) _____					

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N° ES	Doc	PROV	n pag	PROV	n tav	DESCRIZIONE
1	2	PROV	34	PROV	08	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
2	2	PROV		PROV		disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
3	1	RIS				lettera d'incasso, procura o riferimento procura generale
4	0	RIS				designazione inventore
5	0	RIS				documenti di priorità con traduzione in italiano
6	0	RIS				autorizzazione o atto di cessione
7	0					nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE	
Data	N° Protocollo
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____
____/____/____	____/____/____

3) attestati di versamento, totale lire Cinquecentosessantacinquemila.=

COMPILATO IL 04/02/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Diego Pallini

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO codice 15

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI99A 000210 Reg A

L'anno millenovecento NOVANTANOVE il giorno QUATTRO del mese di FEBBRAIO

Il/i richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE \_\_\_\_\_

IL DEPOSITANTE

timbro  
dell'ufficio

UFFICIALE ROGANTE  
CORTONESI MAURIZIO

1498PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

MI 99A 000210

REG. A

DATA DI DEPOSITO

04/02/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

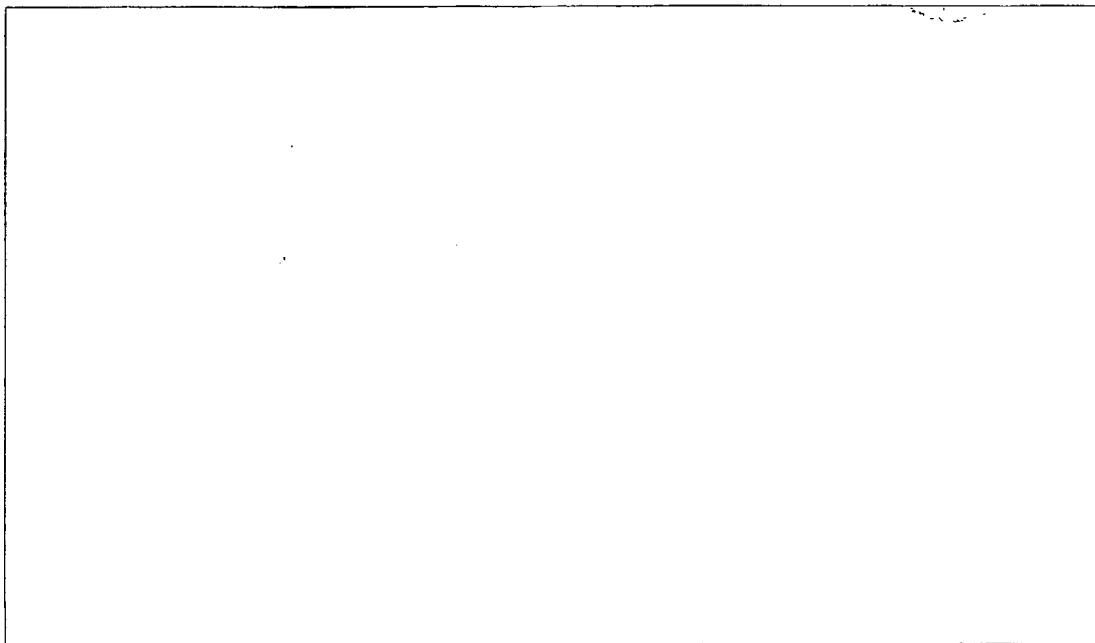
Biosensore amperometrico reattivo al pH.

L. RIASSUNTO

La presente invenzione descrive un nuovo biosensore elettrochimico che comprende (i) un biocatalizzatore che produce una variazione del pH quando interagisce con l'analita da determinare ed (ii) un composto che esibisce diverse proprietà redox nelle sue forme protonizzate e non (composto redox sensibile al pH). Gli elementi di cui sopra vengono integrati in un sistema biosensore composto da un elettrodo di lavoro e da un elettrodo di riferimento collegati ad un amperometro. In presenza dell'analita, il sistema genera un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita. I biosensori qui descritti permettono la rilevazione precisa di un ampio spettro di analiti. Essi possono essere usati nei settori della diagnostica umana e veterinaria, nei processi industriali, nel controllo qualità di alimenti e mangimi, nelle biotecnologie, nell'industria farmaceutica, nel monitoraggio ambientale, ecc.



M. DISEGNO



1498PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

MI 99 A 000 210

"Biosensore amperometrico reattivo al pH"

a nome di SAICOM S.r.l.

4 FEB. 1999

con sede in TRIESTE

Inventori designati : PIZZARIELLO Andrea, STREDANSKY Miroslav,  
STREDANSKA Silvia, MIERTUS Stanislav.

depositata il

con n.

\*\*\*\*\*

### **CAMPO DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione si colloca nel settore dell'analisi elettrochimica. Si riferisce in particolare a sistemi per la rilevazione elettrochimica di analiti basati sull'attività di biocatalizzatori. L'invenzione ha per oggetto un nuovo gruppo di biosensori ed il loro uso in un metodo di determinazione degli analiti.

### **TECNICA ANTERIORE**

Un biosensore è un dispositivo che incorpora un elemento biologico sensibile collegato ad un trasduttore o integrato all'interno di esso. Lo scopo è quello di produrre segnali elettronici proporzionali alla concentrazione della sostanza specifica che deve essere determinata.

L'introduzione dei biosensori ha fornito un'alternativa interessante all'analisi tradizionale di laboratorio. Grazie alla semplicità di manipolazione, compattezza e versatilità d'uso, i biosensori permettono di eseguire con facilità l'analisi di campioni direttamente sul luogo. Dispositivi specifici e sensibili sono stati utilizzati nella diagnostica medica, nel monitoraggio della qualità degli alimenti, nel monitoraggio

ambientale, nella fermentazione, e nel controllo analitico e via di seguito.

I biosensori elettrochimici, specialmente quelli amperometrici, rivestono un ruolo significativo nell'applicazione di questi dispositivi.

I biosensori amperometrici emettono un segnale lineare e sono caratterizzati da un'alta sensibilità. In condizioni favorevoli, concentrazioni di  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M dell'analita possono essere rilevate ed un intervallo dinamico tra tre e quattro ordini di grandezza può essere ottenuto facilmente (G.S. Wilson, in: *Biosensors, Fundamentals and Applications*, A.P.F. Turner, I. Karube and G.S. Wilson Ed., Oxford Univ. Press, 165-179, 1987).

La prima generazione di biosensori amperometrici si basa sull'ossidazione di un'analita mediante ossidasi (biocatalizzatori) che utilizza l'ossigeno come elettrone-accettore. Di conseguenza o la diminuzione nella concentrazione di ossigeno oppure l'aumento della concentrazione di perossido di idrogeno prodotto vengono misurati da un elettrodo in forma di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

Nei sistemi di seconda generazione, l'enzima esegue la prima reazione redox con il substrato (analita) ma viene poi riossidato da un mediatore redox sostituito all'ossigeno; il mediatore viene a sua volta ossidato dall'elettrodo ed il segnale amperometrico corrispondente viene misurato. Molti esempi di mediatore che contengono biosensori vengono citati in una review di Gorton (*Electroanalysis*, 7, 23-45, 1995).

Dal momento che i mediatori redox trasportano elettroni, che arrivano al centro redox del biocatalizzatore dal substrato all'elettrodo di lavoro,

questi biosensori amperometrici hanno come limite l'utilizzo di biocatalizzatori appartenenti al gruppo delle ossidoreduttasi. Di conseguenza con questi biosensori è possibile effettuare la determinazione solo di un gruppo limitato di analiti.

Un certo numero di enzimi appartenenti ai gruppi di idrolasi, trasferasi, ossidoreduttasi, liasi, ligasi, tra cui in particolare decarbossilasi, fosforilasi, esterasi, fosfatasi, deaminasi, chinasi, cambia la concentrazione di ioni  $H^+$  (o per consumo o per produzione) con la loro interazione biocatalitica con un substrato e tale cambiamento dipende dalla concentrazione del substrato stesso. Questi biocatalizzatori in combinazione con un trasduttore potenziometrico adeguato, ad es. il tipico elettrodo a vetro pH-sensibile, o ad un elettrodo a membrana solida e liquida pH-sensibile, vengono utilizzati per la realizzazione di biosensori potenziometrici. Esempi di analiti che vengono determinati da questi biosensori sono l'urea, la penicillina, il glucosio, il malato (S.S. Kuan e G.G. Guibault, In: *Biosensors, Fundamentals and Applications*, A.P.F. Turner, I. Karube e G.S. Wilson Ed., Oxford Univ. Press, 135-152, 1987; Palleschi et al., *Talanta*, 41, 917-923, 1994). Gli svantaggi di questi biosensori sono costituiti da una risposta logaritmica e da una bassa sensibilità. Il loro range analiticamente utile va generalmente da  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  M, eccezionalmente a  $10^{-5}$  M.

Un altro gruppo di biosensori potenziometrici utilizza una combinazione di biocatalizzatori che modificano il pH interfacciati a transistor ad effetto di campo ione-sensibili (ISFET). Gli ISFET vengono preparati con una tecnologia di fabbricazione a base di silicio dove lo strato di nitrato di



silicio depositato sulla superficie viene usato principalmente come trasduttore pH-sensibile. Alcuni esempi sono costituiti da biosensori per la determinazione di urea, ATP, penicillina, glucosio e acetilcolina (G.F. Blackburn, In: Biosensors, Fundamentals and Applications, A.P.F. Turner, I. Karube e G.S. Wilson Ed., Oxford Univ. Press, 481-530, 1987).

Gli svantaggi presentati da questo tipo di biosensore sono costituiti da una bassa sensibilità (risposta misurabile nel range di concentrazione da  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  M) insieme con un costo elevato ed una procedura di fabbricazione complessa.

Recentemente, è stato descritto un nuovo gruppo di biosensori elettrochimici, basati sulla combinazione di un biocatalizzatore che modifica il pH e di un trasduttore conduttometrico (A.Q. Contractor et al., Electrochim. Acta, 39, 1321-1324, 1994; J.M. Goncalves Laranjeira et al., Anal. Lett. 30, 2189-2209, 1997; Nishizawa et al., Anal. Chem., 64, 2642-2644, 1992). Questo nuovo tipo di biosensori sfrutta l'effetto del pH sulle proprietà elettriche di un polimero conduttivo (polianilina, polipirrolo) depositato sulla superficie dell'elettrodo. Essi consistono di due elettrodi di platino a distanza di diversi  $\mu\text{m}$ , coperti dal film di polimero conduttore e da una membrana enzimatica. Questi biosensori non hanno bisogno di un elettrodo di riferimento classico. Con questo tipo di biosensore è possibile misurare analiti come l'urea, il glucosio, i lipidi, l'emoglobina e la penicillina. Questi biosensori forniscono una risposta rapida ed una sensibilità migliore dei biosensori potenziometrici (il range analiticamente utile va da  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  M, nel migliore dei casi  $10^{-6}$

M); tuttavia la loro sensibilità è ancora lontana da quella ottenibile con biosensori amperometrici. Inoltre, essi hanno bisogno di una procedura di fabbricazione costosa e precisa.

Di conseguenza, in considerazione degli svantaggi elencati precedentemente, si avverte l'esigenza di individuare biosensori elettrochimici alternativi dotati di una maggiore sensibilità e che richiedano una procedura di fabbricazione semplice.

### **SOMMARIO**

La presente invenzione descrive un nuovo biosensore elettrochimico che comprende (i) un biocatalizzatore che produce una variazione del pH quando interagisce con l'analita da determinare ed (ii) un composto che esibisce diverse proprietà redox nelle sue forme protonizzate e non (composto redox sensibile al pH).

Gli elementi di cui sopra vengono integrati in un sistema biosensore composto da un elettrodo di lavoro e da un elettrodo di riferimento collegati ad un amperometro. In presenza dell'analita, il sistema genera un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita. I biosensori qui descritti permettono la rilevazione precisa di un ampio spettro di analiti. Essi possono essere usati nei settori della diagnostica umana e veterinaria, nei processi industriali, nel controllo qualità di alimenti e mangimi, nelle biotecnologie, nell'industria farmaceutica, nel monitoraggio ambientale, ecc.

### **DESCRIZIONE DELLE FIGURE**

*Le Figure 1-7 rappresentano il cambiamento di corrente con il pH ad adeguati potenziali costanti utilizzando vari composti redox sensibili al*



*pH e vari elettrodi come descritto agli Esempi 1-7.*

**Figura 1:** elettrodo di platino; emateina in soluzione alla concentrazione di 0.5 mM (curva a) e 2.5 mM (curva b);

**Figura 2:** emateina in soluzione; elettrodo a pasta di carbone (curva a) ed elettrodo composito solido (curva b);

**Figura 3:** elettrodo d'oro con monostrato di blu di metilene;

**Figura 4:** elettrodo composito solido; ematossillina in soluzione (curva a), quercitina in soluzione (curva b), armalina in soluzione (curva c);

**Figura 5:** elettrodo composito solido con orto-fenilendiammina elettropolimerizzata;

**Figura 6:** elettrodo di platino con pirogallolo elettropolimerizzato;

**Figura 7:** elettrodo solido composito modificato con laurilgallato;

*Le Figure 8-16 mostrano le curve di calibrazione di vari analiti misurati con i biosensori dell'invenzione descritti negli Esempi 8-17.*

**Figura 8:** biosensore per la determinazione dell'urea, emateina in soluzione, elettrodo di platino (curva a) o elettrodo composito solido (curva b);

**Figura 9:** biosensore per la determinazione dell'urea, emateina in soluzione, elettrodo composito solido contenente ureasi, in presenza di tampone fosfato 5 mM (curva a) o 1 mM (curva b);

**Figura 10:** biosensore per la determinazione dell'urea, elettrodo solido composito contenente lauril gallato;

**Figura 11:** biosensore per la determinazione dell'ossalacetato, emateina in soluzione, elettrodo solido composito;

**Figura 12:** biosensore per la determinazione del glucosio, elettrodo

composito solido modificato con film di poli(orto-fenilendiammina);

**Figura 13:** biosensore per la determinazione dell'idrogenocarbonato, emateina in soluzione, elettrodo di platino;

**Figura 14:** biosensore per la determinazione della penicillina, emateina in soluzione, elettrodo di platino;

**Figura 15:** biosensore per la determinazione dell'ATP, emateina in soluzione, elettrodo di platino;

**Figura 16:** biosensore per la determinazione dell'urea, elettrodo d'oro con monostrato di blu di metilene.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

L'oggetto della presente invenzione è un sistema biosensore amperometrico per la determinazione degli analiti, che comprende:

(a) almeno un biocatalizzatore che produce una variazione di pH a seguito della sua interazione con l'analita da determinare;

(b) almeno un composto che esibisca diverse proprietà redox nelle sue forme protonizzate e non. Detto composto sarà di seguito indicato come "composto redox pH-sensibile";

(c) un elettrodo di lavoro;

(d) un elettrodo di riferimento

Gli elettrodi citati alle voci (c) e (d) sono entrambi collegati ad un amperometro.

In una delle realizzazioni dell'invenzione, il biocatalizzatore (a) ed i composti redox sensibili al pH (b) sono tutti contenuti nell'elettrodo di lavoro; in alternativa uno o più di tali componenti sono presenti nella soluzione di misura in cui gli elettrodi sono immersi.



Il biosensore dell'invenzione può essere a scelta coperto da un'adeguata membrana semipermeabile.

Il principio operativo dei biosensori in oggetto è di seguito descritto. Gli elettrodi vengono messi in una soluzione di misura e tra loro viene applicato un potenziale di lavoro. La reazione agli elettrodi viene fatta proseguire fino al raggiungimento dell'equilibrio tra la forma ossidata e la forma ridotta del composto redox pH-sensibile (b). Questa reazione elettrochimica viene accompagnata da un flusso di elettroni misurato come corrente elettrica mediante l'amperometro. Fino a questo punto, il biocatalizzatore (a) non viene coinvolto. Una volta che il campione con l'analita viene aggiunto alla soluzione, si verifica la reazione biocatalizzatore/analita ed il pH si modifica conseguentemente; la variazione di pH sposta l'equilibrio delle forme protonizzate/non protonizzate del composto redox (b). Dal momento che queste forme del composto redox esibiscono diverse proprietà redox, cambiamenti nella loro concentrazione danno luogo ad un cambiamento di corrente al potenziale costante applicato. Il cambiamento di corrente viene monitorato dall'amperometro e dipende dalla concentrazione del substrato.

Per quanto riguarda la natura di detto biocatalizzatore (a), questo può essere una qualsiasi entità biologica capace di interagire con l'analita da determinare e di causare una variazione di pH come risultato di questa interazione. In pratica, ogni biocatalizzatore che reagisca con il suo substrato normale generando o consumando ioni  $H^+$  può essere usato come biocatalizzatore per la determinazione di quel substrato.

Biocatalizzatori adeguati sono ad esempio enzimi che catalizzano reazioni che implicano la produzione o il consumo di ioni  $H^+$ ; esempi tipici sono le idrolasi, ossidoreduttasi, transferasi, liasi, ligasi e preferibilmente le fosforilasi, decarbossilasi, esterasi, proteinasi, deaminasi, amidasi, fosfatasi, sintetasi. Altri esempi di biocatalizzatori con le stesse caratteristiche si possono trovare tra le immunoproteine, gli acidi nucleici, i sinzimi, gli anticorpi catalitici.

Altri biocatalizzatori che modificano il pH si possono ritrovare tra le strutture biologiche o gli aggregati biologici come le cellule, i frammenti cellulari, i tessuti, gli organelli ed i loro frammenti, frazioni, omogenati, estratti, lisati.

E' possibile utilizzare un singolo biocatalizzatore oppure una miscela di due o più degli stessi.

La scelta del biocatalizzatore adatto è determinata dalla natura dell'analita stesso, in base alla regola secondo la quale l'analita deve agire come substrato per il biocatalizzatore: per esempio, le esterasi saranno indicate per la determinazione analitica degli esteri; le decarbossilasi saranno utilizzate per la determinazione degli acidi carbossilici, le deaminasi per le ammine e via di seguito.

Esempi dei biocatalizzatori preferiti per la presente invenzione sono: ureasi, ossalacetato decarbossilasi, glucosio ossidasi, anidrase carbonica, penicillinasi, apirasi, per la determinazione rispettivamente di urea, ossalacetato, glucosio, idrogenocarbonati, penicillina, ATP.

Nei biosensori dell'invenzione, i biocatalizzatori (a) possono essere incorporati nell'elettrodo di lavoro oppure possono essere presenti nella

soluzione di misura in forma dispersa o solubile.

L'incorporazione di detto biocatalizzatore nell'elettrodo di lavoro è particolarmente indicato per la preparazione di biosensori compositi.

Detti biocatalizzatori possono essere anche applicati alla superficie degli elettrodi di lavoro. In questo caso, essi vengono normalmente immobilizzati mediante metodi fisici o chimici. I metodi preferiti per l'immobilizzazione consistono nella copertura con membrana semipermeabile, inclusione in un polimero o uno strato di gel, crosslinking con agenti bifunzionali, legame covalente, adsorbimento, immobilizzazione nella membrana esterna.

La sistemazione del biocatalizzatore nella soluzione di misura viene normalmente effettuata sciogliendo il biocatalizzatore in soluzione, oppure disperdendolo omogeneamente. Ciò è particolarmente indicato per i biosensori usa e getta a pellicola spessa, dove il biocatalizzatore viene disciolto in tutto il volume del campione aggiunto. E' indicata per i biosensori specifici per gli analiti polimerici perché evita l'insorgere di impedimenti sterici che si verificherebbero nel caso del biocatalizzatore immobilizzato. Un'altra possibile modo di alloggiamento del biocatalizzatore nel sistema biosensore dell'invenzione consiste nella sua immobilizzazione in un piccolo bioreattore inserito di fronte all'elettrodo di lavoro quando il sistema di flusso viene applicato.

Quando l'attività del biocatalizzatore richiede la presenza di un cofattore, ad es. un coenzima o un attivatore, i biosensori dell'invenzione comprendono anche detto cofattore. Il cofattore viene preferibilmente messo insieme al biocatalizzatore, cioè entrambi sono presenti sulla

superficie dell'elettrodo, oppure entrambi nel corpo dell'elettrodo o nella soluzione.

Un ulteriore elemento del sistema biosensore secondo l'invenzione è rappresentata dal composto redox pH-sensibile (b). Questi sono composti che sono presenti in soluzione in equilibrio tra forma protonizzata e quella non protonizzata, che hanno diversi potenziali redox.

I composti redox sensibili al pH possono essere scelti nel gruppo degli idrocarburi ciclici che contengono da 4 a 30 atomi di carbonio e sostituiti con almeno un gruppo scelto tra  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$ ,  $=O$ ,  $=S$ ,  $=NH$ ,  $-OR_1$ ,  $-SR_1$ ,  $-NHR_1$ ,  $-NR_1R_2$ ,  $=NR_1$ , dove  $R_1$  ed  $R_2$  sono catene di idrocarburi eventualmente ulteriormente sostituite, o dal gruppo di composti eterociclici, contenenti da 3 a 30 atomi di carbonio ed uno o più eteroatomi scelti tra N, S, O, Se, Te, B, P, As, Sb, Si, eventualmente sostituiti con un gruppo scelto tra  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$ ,  $=O$ ,  $=S$ ,  $=NH$ ,  $-OR$ ,  $-SR$ ,  $-NHR$ ,  $-NR_1R_2$ ,  $=NR$ , dove  $R$  ed  $R_2$  sono catene di idrocarburi indipendenti. Questi composti possono essere a scelta in forma di monomero, oligomero o polimero. I composti di cui sopra possono essere utilizzati da soli o in una miscela di due o più di loro.

Le classi preferite di composti redox sensibili al pH sono indicatori di pH (ad es. ematosillina, emateina), fenossazine e fenotiazine (ad es. blu metilene), antiossidanti naturali (ad es. quercitina, flavonoidi, alchilgallati) orto-fenilendiammine o para-fenilendiammine polimerizzate. Secondo l'invenzione, il composto redox pH-sensibile è presente nell'elettrodo di lavoro oppure viene sciolto nella soluzione di misura. I



composti redox sensibili al pH che sono solubili in acqua vengono preferibilmente aggiunti alla soluzione; quelli insolubili in acqua vengono preferibilmente usati per modificare l'elettrodo di lavoro.

Quando è presente nell'elettrodo di lavoro, il composto redox pH-sensibile può essere depositato sulla sua superficie in forma libera, oppure può essere chimicamente o fisicamente legato (immobilizzato) alla superficie dell'elettrodo di lavoro; oppure può essere un componente del corpo di un elettrodo di lavoro composito.

Se il composto redox pH-sensibile è un polimero o un oligomero, questo può essere anche preparato in situ sulla superficie dell'elettrodo di lavoro mediante polimerizzazione chimica o fisica, preferibilmente mediante una polimerizzazione radicalica, elettropolimerizzazione o fotopolimerizzazione.

Tra i composti redox citati sopra, i coloranti fenotiazinici e le poli(ortofenilendiammine) sono particolarmente indicati per essere fisicamente o chimicamente legati alla superficie dell'elettrodo. L'emateina, l'ematossillina, i coloranti fenotiazinici e la quercitina sono particolarmente indicati per essere aggiunti alla soluzione di misura. Gli alchil gallati sono preferibilmente adatti per essere incorporati nel corpo del biosensore come componenti di un elettrodo di lavoro composito.

Vari elettrodi di lavoro possono essere utilizzati quale elemento (c) del sistema biosensore dell'invenzione. Detti elettrodi di lavoro sono scelti nel gruppo composto da elettrodi di lavoro classici usati in amperometria (come ad esempio, elettrodi di platino, oro, mercurio, grafite vetrosa) oppure da elettrodi compositi (come ad esempio gli elettrodi di grafite).

Similmente, gli elettrodi di riferimento utili quale elemento (d) del sistema biosensore dell'invenzione sono comunemente disponibili in amperometria. Gli elettrodi di riferimento preferiti sono gli elettrodi standard a calomelano (SCE) e ad Ag/AgCl. L'elettrodo Ag/AgCl è particolarmente indicato, grazie alla possibilità di assumere vari design (forme), come ad esempio, coclea, strato, o barra.

Il potenziale di lavoro da applicare tra i due elettrodi è preferibilmente vicino a 0.0 mV oppure è negativo (verso Ag/AgCl elettrodo di riferimento). L'applicazione di questo potenziale riduce sostanzialmente possibili interferenze elettrochimiche che derivano da composti interferenti facilmente ossidabili presenti nei campioni reali.

Diversamente dai biosensori amperometrici classici, dove le misure sono eseguite in soluzioni fortemente tamponate che richiedono un pH costante, nella presente invenzione le misure sono eseguite con soluzioni non tamponate oppure con soluzioni di misura con una bassa capacità tampone. Se viene utilizzata una soluzione con bassa capacità tampone, la concentrazione preferita dei composti tampone è compresa nell'intervallo tra 0.5 e 20 mM.

Il termine "soluzione di misura" utilizzato in questa invenzione non è strettamente limitato ai sistemi dove tutti i componenti sono sciolti, ma racchiude anche i sistemi liquidi dove almeno parti delle componenti sono contenute in uno stato disperso omogeneamente, come le sospensioni, le emulsioni e via di seguito.

Il sistema biosensore realizzato come descritto nella presente invenzione permette di determinare, per via amperometrica, molti più



analiti di quanti non sia finora possibile. Il segnale in uscita è lineare. Tale linearità permette di correlare facilmente all'interno di un ampio range di concentrazione i cambiamenti di corrente registrati per le concentrazioni dell'analita.

Il sistema biosensore secondo la presente invenzione esibisce una buona specificità e sensibilità, una procedura di fabbricazione semplice ed un design versatile. La sensibilità dei biosensori descritti di seguito (sezione Esempi) si situa nel range da 0.1 a 5  $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  e i limiti di rilevamento sono compresi nell'intervallo compreso tra  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  M.

I biosensori della presente invenzione sono versatili per quanto riguarda la variabilità del biocatalizzatore, i composti redox pH-sensibili, gli elettrodi di lavoro e di riferimento e la sistemazione del biosensore. Essi permettono anche una buona variabilità nel design del biosensore. Infatti, il sistema biosensore dell'invenzione può essere applicato ai design più comuni di biosensori, che hanno diverse forme, dimensioni e sistemazione, quali ad es. i biosensori a striscia, puntale, ago. Disco, tubo, spirale, strato spesso, strato sottile ed altre forme degli elettrodi ben si adattano al biosensore descritto nell'invenzione. La costruzione dei microelettrodi basata sulla presente invenzione è anche possibile.

Il sistema biosensore secondo la presente invenzione può essere vantaggiosamente usato nella diagnostica sia nell'uomo che negli animali, nei processi industriali, nell'industria agro-alimentare, nelle biotecnologie, nell'industria farmaceutica, nel monitoraggio ambientale e via di seguito.

Tutti questi usi sono compresi nella presente invenzione.

Un'ulteriore realizzazione dell'invenzione riguarda un metodo per determinare la concentrazione di analiti caratterizzata dall'utilizzo dei nuovi biosensori descritti precedentemente.

Un metodo preferito di determinazione comprende i seguenti passaggi:

- (a) sistemare gli elettrodi in una soluzione di misura;
- (b) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- (c) misurare una corrente di base;
- (d) aggiungere alla soluzione il campione contenente l'analita da determinare;
- (e) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita;
- (f) eventualmente sottrarre il cambiamento di corrente misurato con un elettrodo di bianco dal valore ottenuto in (e).

Il passaggio (f) viene aggiunto in modo da eliminare possibili interferenze. L'elettrodo di bianco differisce da un normale elettrodo di lavoro come descritto finora, soltanto in quanto contiene detti biocatalizzatori in forma non-attiva oppure non li contiene affatto. La procedura per l'ottenimento del cambiamento di corrente misurato con l'elettrodo di bianco è identica a quella descritta nei passaggi (a)- (e).

Tutte le letture vengono fatte dopo che il campione è stato uniformemente diluito nella soluzione di misura ed il segnale è stabile.

Come scritto sopra, l'invenzione è compatibile con diversi design del biosensore, come puntali, aghi, strisce, etc. Alcune di queste forme (vedi biosensori a striscia) lavorano in assenza di una soluzione di misura e reagiscono immediatamente per contatto con il campione contenente



l'analita. Questo contatto avviene ad esempio per aggiunta al biosensore di una goccia del campione contenente l'analita, sul biosensore oppure per immersione del biosensore in questa stessa soluzione. In questi casi il metodo di determinazione dell'analita viene così modificato:

- (a) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- (b) misurare una corrente di base;
- (c) mettere il campione contenente l'analita in contatto con il biosensore;
- (d) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita;
- (e) eventualmente sottrarre il cambiamento di corrente misurato con un elettrodo di bianco dal valore ottenuto in (d).

I metodi di cui sopra possono essere qualitativi (cioè permettono di determinare la presenza dell'analita nella soluzione) oppure quantitativi (cioè permettono di determinare la sua concentrazione) poiché il cambiamento di corrente è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

Fino ad ora si è inteso che il biocatalizzatore reagisce positivamente con l'analita provocando il cambiamento di pH. In una ulteriore realizzazione dell'invenzione, il sistema individua la presenza di un analita che inibisce il biocatalizzatore. L'interazione funziona in questo caso in senso negativo ed il cambiamento di corrente che dipende dal grado di inibizione sarà proporzionale alla concentrazione dell'analita-inibitore.

Questo aspetto amplia ulteriormente lo spettro di analiti individuabili con la presente invenzione. Infatti, ogni sostanza che funzioni come inibitore

di un biocatalizzatore che modifica il pH può essere così individuata.

Al fine di implementare questo aspetto dell'invenzione, il metodo di misura viene in parte modificato aggiungendo al sistema il normale substrato del biocatalizzatore prima di aggiungere il campione con l'analita-inibitore che deve essere testato. Il metodo di conseguenza comprende le seguenti fasi:

- (a) sistemare gli elettrodi in una soluzione di misura;
- (b) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- (c) aggiungere il substrato di detto biocatalizzatore alla soluzione di misura;
- (d) misurare una corrente di base;
- (e) aggiungere alla soluzione il campione contenente l'analita-inibitore da determinare;
- (f) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita-inibitore;
- (g) eventualmente sottrarre il cambiamento di corrente misurato con un elettrodo di bianco dal valore ottenuto in (f).

Se il design del biosensore (vedi biosensore a striscia) consente di lavorare in assenza di una soluzione di misura, allora il metodo di cui sopra viene modificato come segue:

- (a) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- (b) aggiungere il substrato di detto biocatalizzatore;
- (c) misurare una corrente di base;
- (d) mettere il campione contenente l'analita-inibitore in contatto con il biosensore;

(d) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita-inibitore;

(e) eventualmente sottrarre il cambiamento di corrente, misurata con un elettrodo di bianco, dal valore misurato in (d).

Il passaggio (c) viene condotto aggiungendo al biosensore una goccia del campione contenente l'analita-inibitore oppure per immersione nella stessa soluzione.

Questo metodo può essere ulteriormente usato per determinare le attività enzimatiche. In questo caso, i cambiamenti di corrente devono essere misurati in dipendenza del tempo.

L'invenzione viene ora illustrata con i seguenti esempi sperimentali, che tuttavia non sono limitativi.

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **Esempio n.1**

*Variazione dei cambiamenti di corrente con il pH in presenza di emateina in soluzione utilizzando un elettrodo di platino.*

L'emateina (Fluka, Cat. No. 51230) viene sciolta in tampone fosfato 0.05 M contenente 0.1 M di cloruro di sodio. L'elettrodo di lavoro in platino e l'elettrodo di riferimento SCE vengono immersi nella soluzione e la corrente viene misurata con un rilevatore amperometrico Amel 559 (Amel Instruments, Milano, Italy) al potenziale costante di 0.0 mV. Il valore del pH diminuisce con l'aggiunta di aliquote di acido solforico 2M ed il corrispondente cambiamento di corrente viene monitorato. Contemporaneamente il pH viene misurato dal pH-metro (PHM 85, Radiometer, Copenhagen, Danimarca). La relazione tra il cambiamento

di corrente ed il pH per due concentrazioni di emateina (0.5 mM - curva a; e 2.5 mM - curva b) è illustrato alla Figura 1.

### **Esempio n. 2**

*Variazione dei cambiamenti di corrente con il pH in presenza di emateina in soluzione usando elettrodi compositi.*

L'elettrodo a pasta composita viene preparato mescolando sotto agitazione vigorosa 7 parti (p/p) di grafite (Fluka, Cat. No. 50870) con 3 parti (p/p) di olio di paraffina (Fluka, Cat. No. 76235) in mortaio. La miscela viene introdotta in un tubo di plastica (diametro interno 2 mm) dotato di un cilindretto di ottone. L'elettrodo a pasta composita viene preparato miscelando vigorosamente 2 parti (p/p) di grafite con 3 parti (p/p) di n-eicosano fuso (Sigma, Cat. No. E-9752) a 45°C. Tale miscela viene introdotta in un tubo di plastica (diametro interno 2 mm) dotato di un cilindretto di ottone. Entrambi gli elettrodi vengono levigati su un foglio di carta prima dell'uso. Le misure elettrochimiche vengono eseguite come descritto nell'Esempio 1 con 0.5 mM di emateina ed i cambiamenti di corrente ottenuti vengono illustrati alla Figura 2 (curva a - elettrodo a pasta composita, curva b - elettrodo solido composito).

### **Esempio n. 3**

*Variazione dei cambiamenti di corrente con il pH utilizzando un elettrodo d'oro modificato con blu di metilene.*

L'elettrodo d'oro appena pulito (Amel Instruments) viene immerso in una soluzione 0.5 mM di blu di metilene (Aldrich, Cat. No. 86, 124-3) per 12 ore. Quindi, l'elettrodo viene adeguatamente risciacquato con acqua deionizzata. Le misure elettrochimiche vengono svolte come descritto



nell'Esempio n.1, utilizzando un potenziale di lavoro di -100 mV (contro SCE). I risultati vengono illustrati nella Figura 3.

#### **Esempio n. 4**

*Variazione dei cambiamenti di corrente con il pH utilizzando un elettrodo composito in presenza di ematossilina, quercitina ed armalina in soluzione.*

Gli elettrodi solidi compositi vengono preparati come descritto all'Esempio n. 2. Il pH viene misurato in soluzioni di 0.5 mM di ematossilina, quercitina, armalina utilizzando il tampone descritto all'Esempio n.1. Il potenziale di lavoro per l'ematossilina e la quercitina è di 0.0 mV (contro SCE), per l'armalina è invece 600 mV. I risultati sono illustrati alla Figura 4 (curva a -ematossilina; curva b - quercitina; curva c - armalina).

#### **Esempio n. 5**

*Variazione dei cambiamenti di corrente con il pH utilizzando un elettrodo composito solido la cui superficie è stata modificata con un film di poli-orto-fenilendiammina.*

L'elettrodo composito solido viene preparato miscelando vigorosamente la grafite con n-eicosano fuso (rapporto del peso 1:1) a 45°C. La miscela così ottenuta viene introdotta in un tubo di plastica (diametro interno 2 mm) provvisto di un cilindretto di ottone. Una pellicola di poli-(orto-fenilendiammina) viene depositata sulla superficie dell'elettrodo levigato mediante polimerizzazione elettrochimica del monomero di orto-fenilendiammina (Sigma, Cat. No P-9029) in soluzione acquosa. Tale processo viene eseguito nel seguente modo: la scansione del potenziale

di elettrodo viene ripetuta 30 volte tra -0.5 mV e 0.7 V (contro SCE) a 50 mVs<sup>-1</sup> in un tampone privo di ossigeno di 0.1 mM acetato a pH 5.0 contenente 0.5 mM di orto-fenilendiammina in atmosfera inerte. L'elettrodo modificato viene quindi risciacquato completamente con il tampone fosfato. Questo biosensore viene testato a diversi valori di pH di una soluzione ed il cambiamento di corrente viene misurato seguendo la stessa procedura descritta all'Esempio 1. Il potenziale di lavoro è di -600 mV. I risultati sono illustrati alla Figura 5.

#### **Esempio n. 6**

*Variazione dei cambiamenti di corrente per un elettrodo di platino la cui superficie è modificata con polipirogallolo.*

La pellicola di polipirogallolo viene depositata sulla superficie appena pulita dell'elettrodo di platino mediante polimerizzazione elettrochimica di 25 mM di pirogallolo (Aldrich, Cat. Mo. 25.400-2) in soluzione acquosa contenente tampone fosfato 0.15 M (pH 7.0) e tetraetilammonio tetrafluoroborato 0.1 M (Aldrich, Cat. No. 24, 214-4). La scansione del potenziale dell'elettrodo viene ripetuta 3 volte tra 0.0 V ed 1.1 V (contro SCE) a 50 mVs<sup>-1</sup>. L'elettrodo modificato viene poi risciacquato completamente con il tampone fosfato. Questo biosensore viene testato a diversi valori di pH di una soluzione ed il cambiamento di corrente viene misurato con la stessa procedura descritta all'Esempio 1. Il potenziale di lavoro è di 200 mV. I risultati sono illustrati alla Figura 6.

#### **Esempio n. 7**

*Variazione dei cambiamenti di corrente con il pH per un elettrodo solido composito modificato con lauril gallato.*



La polvere di grafite viene modificata come segue: 100 mg di lauril gallato (Fluka, Cat. No. 48660) vengono sciolti in 2 ml di acetone e 400 mg di grafite vengono aggiunti alla soluzione. La miscela viene poi sottoposta ad agitazione fino a renderla omogenea e l'acetone viene quindi evaporato con un flusso di aria forzata a temperatura ambiente. 100 mg di acido laurico (Fluka, Cat. Mo. 61610) e 150 mg di 2-esadecanone (Fluka, Cat. No. 69250) vengono sciolti in un crogiolo di porcellana a 50°C e miscelati vigorosamente con 250 mg della grafite modificata. Un tubo di plastica (diametro interno 2 mm) provvisto di un cilindretto di ottone viene riempito con questa miscela e poi il materiale dell'elettrodo viene solidificato a temperatura ambiente. La superficie dell'elettrodo viene levigata con carta vetrata e ripulita con un foglio di carta comune. La dipendenza del cambiamento di corrente dal pH dell'elettrodo modificato con lauril gallato si misura con la stessa procedura descritta all'Esempio n.1. Il potenziale di lavoro è di 200 mV. I risultati sono illustrati alla Figura 7.

#### **Esempio n. 8**

*Preparazione del biosensore per la determinazione di urea basato su un elettrodo di platino modificato con ureasi ed emateina in soluzione.*

Una soluzione (2 µl, 10 mg/ml) di ureasi (EC 3.5.1.5., Sigma, Cat. No. U-0376) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo di platino. Dopo essiccazione a temperatura ambiente, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000), fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene immerso in un tampone fosfato 1 mM (pH = 7.35) che contiene emateina 0.5 mM e cloruro di

sodio 0.1 mM. Quindi il biosensore viene polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Si aggiungono alcune aliquote di soluzione di urea (5 mg/ml) al tampone di misura. La relazione tra la concentrazione di urea ed il cambiamento di corrente è rappresentato alla Figura 8 (curva a).

#### **Esempio n. 9**

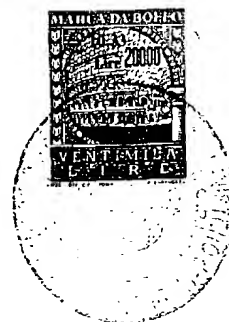
*Preparazione del biosensore per la determinazione dell'urea basato sull'elettrodo composito solido modificato con ureasi ed emateina in soluzione*

L'elettrodo composito solido viene preparato come descritto all'Esempio 2. L'ureasi (2 $\mu$ l, 10 mg) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo pulita. Dopo essiccazione, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000) per mezzo di un anello ad O. Il biosensore viene immerso in tampone fosfato 1mM (pH = 7.35) contenente emateina 0.5 mM e cloruro di sodio 0.1 M. L'elettrodo viene polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Si aggiungono alcune aliquote di soluzione standard di urea (5mg/ml) al tampone di misura. La relazione tra la concentrazione di urea ed il cambiamento di corrente è rappresentata alla Figura 8 (curva b).

#### **Esempio n. 10**

*Preparazione del biosensore per l'urea basato sull'elettrodo composito solido modificato nel corpo ed emateina in soluzione*

La polvere di grafite viene modificata nel seguente modo: 97 mg di polvere di grafite vengono aggiunti a 0.5 ml della soluzione acquosa di ureasi (6 mg/ml). La miscela viene mescolata accuratamente fino a renderla omogenea e l'acqua viene fatta evaporare delicatamente. 50



mg della grafite modificata vengono mescolati a 50 mg di 2-esadecanone a 50°C e la miscela ottenuta viene introdotta in un tubo di plastica (diametro interno di 2 mm) provvisto di un cilindretto di ottone; la miscela viene quindi lasciata raffreddare a temperatura ambiente. L'elettrodo viene levigato con un foglio di carta e coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000). Il biosensore viene immerso nel tampone fosfato (1 o 5 mM, pH 7.50) contenente ematina 0.5 mM e cloruro di sodio 0.1 M e viene poi polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Si aggiungono quindi alcune aliquote di soluzione standard di urea (5 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati ed i risultati sono illustrati alla Figura 9, dove la curva b) si riferisce a 1 mM di tampone fosfato.

#### **Esempio n. 11**

*Preparazione del biosensore per l'urea che utilizza un elettrodo composito solido modificato con ureasi e contenente lauril gallato.*

La polvere di grafite viene modificata nel modo seguente: 20 mg di lauril gallato vengono sciolti in 0.5 ml di acetone e 90 mg di grafite vengono aggiunti alla soluzione. La miscela viene agitata fino a renderla omogenea e l'acetone viene fatto evaporare sotto flusso di aria forzata a temperatura ambiente. 40 mg di 2-esadecanone e 5 mg di acido stearico (Aldrich, Cat. No. 26, 838 - 0) vengono sciolti in un crogiolo di porcellana a 55°C e mescolati vigorosamente con 55 mg della grafite modificata di cui sopra. La miscela viene introdotta in un tubo di plastica (diametro interno 2 mm) provvisto di un cilindretto di ottone. L'ureasi (1 µl, 30 mg/ml) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo appena pulita. Dopo

averlo fatto asciugare, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000) fissata con un anello ad O. Il biosensore viene immerso in un tampone fosfato 1mM (pH. 7.35 contenente cloruro di sodio 0.1 M). Viene poi polarizzato a 200 mV (contro SCE). Si aggiungono quindi varie aliquote di soluzioni standard di urea (5 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. La relazione tra la concentrazione di urea ed il cambiamento di corrente sono illustrati alla Figura 10.

#### **Esempio n. 12**

*Preparazione del biosensore per l'ossalacetato basato sull'elettrodo composito solido modificato con decarbossilasi ossalacetato e con emateina in soluzione.*

L'elettrodo composito solido viene descritto all'Esempio n. 2. La decarbossilasi ossalacetato (EC 4.1.1.3., ICN, Cat. No. 156007, 5,3 U) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo. Dopo averlo asciugato, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000), fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene immerso in tampone fosfato 1mM (pH 8.0) contenente emateina 0.5 mM e cloruro di sodio 0.1 M. Viene quindi polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Vengono aggiunte varie aliquote di soluzione standard di sodio ossalacetato (20 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. La relazione tra la concentrazione di ossalacetato ed il cambiamento di corrente è illustrata alla Figura 11.

#### **Esempio n. 13**

*Preparazione del biosensore basato su un elettrodo composito solido*

*modificato con glucosio ossidasi e ricoperto con una pellicola di poli-(para-fenilendiammina).*

L'elettrodo composito solido con la spessa pellicola di poli-(para-fenilendiammina) viene preparato come descritto all'Esempio 5. La glucosio ossidasi (EC 1.1.3.4, Sigma, Cat. No. G-7016, 2  $\mu$ l, 10 mg/ml) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo, che viene quindi asciugato e coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000), fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene immerso in tampone fosfato, 1mM (pH 7.0) contenente cloruro di sodio 0.1 M. Viene quindi polarizzato a -600 mV (contro SCE). Si aggiungono poi varie aliquote di soluzione standard di glucosio (20 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. Il rapporto tra la concentrazione di glucosio ed il cambiamento di corrente è illustrato alla Figura 12.

#### **Esempio n. 14**

*Preparazione del biosensore idrogeno carbonato basato sull'elettrodo di platino modificato con anidrasi carbonica ed emateina in soluzione.*

Una soluzione di anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1, Sigma, Cat. No. C-4831, 2400 W-A unità, 2  $\mu$ l, 100 mg/ml) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo di platino. Dopo averlo asciugato, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000) fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene immerso in Tris-HCl 4 mM (pH 8.30) contenente 0.5 mM di emateina e 0.1 M di cloruro di sodio. Viene quindi polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Si aggiungono alcune aliquote di soluzione standard di sodio idrogeno-carbonato (10 mg/ml) al

tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. Il rapporto tra la concentrazione di idrogenocarbonati ed il cambiamento di corrente viene illustrato alla Figura 13.

#### **Esempio n.15**

*Preparazione del biosensore basato su un elettrodo di lavoro in platino modificato con penicillinasi e con emateina in soluzione.*

Una soluzione (2  $\mu$ l, 100 mg/ml) di penicillinasi (EC 3.5.2.6, Sigma, Cat. No P-0389) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo di platino. Dopo averlo asciugato a temperatura ambiente, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por® MWCO 6,000 - 8,000) fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene quindi immerso in tampone fosfato 1 mM (pH= 7.5) contenente emateina 0.5 mM e cloruro di sodio 0.1 M. Viene quindi polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Si aggiungono poi alcune aliquote di soluzione standard di benzilpenicillina sodica (20 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. La relazione tra la concentrazione di benzilpenicillina ed il cambiamento di corrente è illustrata alla Figura 14.

#### **Esempio n. 16**

*Preparazione del biosensore per ATP basato su un elettrodo di lavoro in platino modificato con apirasi ed emateina in soluzione.*

Una soluzione (2 $\mu$ l, 200 mg/ml) di apirasi (EC 3.6.1.5, Sigma, Cat. No A-6132) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo in platino. Dopo averlo asciugato a temperatura ambiente, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por® MWCO 6,000 - 8,000) fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene immerso in Tris-HCl 2 mM



(pH = 7.0) contenente 0.5 mM di emateina e 0.25 M di cloruro di sodio. Viene quindi polarizzato a 0.0 mV (contro SCE). Si aggiungono poi varie aliquote di soluzione standard di ATP sale sodico (20 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. Il rapporto tra la concentrazione di ATP ed il cambiamento di corrente è illustrato alla Figura 15.

#### **Esempio n. 17**

*Preparazione del biosensore per l'urea basato su elettrodo in oro modificato con blu di metilene.*

L'elettrodo viene preparato come descritto all'Esempio 3. L'ureasi (3 $\mu$ L, 10 mg/ml) viene applicata sulla superficie dell'elettrodo. Dopo averlo asciugato, l'elettrodo viene coperto con una membrana di dialisi (Spectra/Por MWCO 6,000 - 8,000) fissata mediante un anello ad O. Il biosensore viene immerso in tampone fosfato 1 mM (pH = 7.50) contenente cloruro di sodio 0.1 M. Viene quindi polarizzato a -100 mV (contro SCE). Vengono aggiunte alcune aliquote di soluzione standard di urea (5 mg/ml) al tampone di misura. I cambiamenti di corrente vengono registrati. La relazione tra la concentrazione di urea ed il cambiamento di corrente è illustrata alla Figura 16.

**RIVENDICAZIONI**

1. Un sistema biosensore amperometrico per la determinazione di analiti che comprende:

a) almeno un biocatalizzatore che per reazione con l'analita provoca una variazione di pH;

b) almeno un composto che esibisce diverse proprietà redox nelle sue forme protonizzata e non-protonizzata (composti redox pH-sensibili);

c) un elettrodo di lavoro;

d) un elettrodo di riferimento.

essendo detti elettrodi collegati ad un amperometro.

2. Il sistema biosensore secondo la rivendicazione 1, dove detto biocatalizzatore (a) viene scelto nel gruppo composto da enzimi, sinzimi, cellule, componenti cellulari, tessuti, immunoproteine, acidi nucleici, e loro estratti, loro frazioni, loro frammenti, loro omogenati, loro lisati.

3. Il sistema biosensore secondo la rivendicazione 2, dove detto enzima viene scelto nel gruppo composto da idrolasi, ossidoreduttasi, trasferasi, liasi, ligasi.

4. Il sistema biosensore secondo la rivendicazione 2, dove detto enzima viene scelto nel gruppo composto da fosforilasi, decarbossilasi, esterasi, fosfatasi, deaminasi.

5. Il sistema biosensore secondo la rivendicazione 2, dove detto enzima viene scelto nel gruppo composto da ureasi, ossalacetato decarbossilasi, glucosio ossidasi, anidrasi carbonica, penicillinasi, apirasi.

6. Il sistema biosensore secondo le rivendicazioni 1-5, dove detto



composto redox pH-sensibile (b) viene scelto nel gruppo composto da idrocarburi ciclici, contenenti da 4 a 30 atomi di carbonio e sostituiti con almeno un gruppo selezionato tra -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, =O, =S, =NH, -OR<sub>1</sub>, -SR<sub>1</sub>, -NHR<sub>1</sub>, -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, =NR<sub>1</sub>, dove R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> sono catene di idrocarburi eventualmente ulteriormente sostituite, oppure nel gruppo dei composti eterociclici contenenti da 3 a 30 atomi di carbonio ed uno o più eteroatomi selezionati tra N, S, O, Se, Te, B, P, As, Sb, Si, essendo tali composti eventualmente sostituiti preferibilmente con un gruppo selezionato tra -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, =O, =NH, -OR<sub>1</sub>, -SR<sub>1</sub>, NHR<sub>1</sub>, -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>=NR<sub>1</sub>, dove R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> sono catene di idrocarburi.

7. Il sistema biosensore secondo le rivendicazioni 1-6, dove detto composto redox pH-sensibile (b) è in forma di monomero, oligomero o polimero.

8. Il sistema biosensore secondo le rivendicazioni 1-7, dove detto composto redox pH-sensibile (b) viene scelto tra gli indicatori di pH, i coloranti fenossazinici e fenotiazinici, e gli antiossidanti naturali.

9. Il sistema biosensore in base alla rivendicazione 8, dove detto composto redox pH-sensibile (b) viene selezionato tra ematossillina, emateina, blu di metilene, quercitina, flavonoidi, alchil gallati, orto-fenilendiammina, oppure para-fenilendiammina polimerizzate.

10. Il sistema biosensore secondo le rivendicazioni 1-9, dove detto elettrodo di lavoro (c) è un elettrodo composito di platino, d'oro, di mercurio o di grafite vetrosa.

11. Il sistema biosensore in base alle rivendicazioni 1-10, dove detto elettrodo di riferimento (d) è selezionato nel gruppo composto da

elettrodi Ag/AgCl ed a calomelano.

12. Un metodo di determinazione di analiti caratterizzato dall'uso di un sistema biosensore come descritto nelle rivendicazioni 1-11.

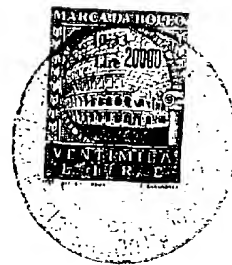
13. Metodo secondo la rivendicazione 12, dove detto metodo consiste in:

- a) sistemare gli elettrodi in una soluzione di misura;
- b) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- c) misurare una corrente di base;
- d) aggiungere alla soluzione il campione contenente l'analita da determinare;
- e) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita;
- f) eventualmente sottrarre il cambiamento di corrente misurato con un elettrodo di bianco dal valore ottenuto in (e).

14. Metodo secondo la rivendicazione 12, dove detto metodo consiste in:

- a) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- b) misurare una corrente di base;
- c) mettere il campione contenente l'analita in contatto con il sistema biosensore;
- d) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'analita;
- e) eventualmente sottrarre il cambiamento di corrente misurato con un elettrodo di bianco dal valore ottenuto in (d).

15. Metodo secondo la rivendicazione 12, dove il biocatalizzatore



contenuto nel sistema biosensore viene selezionato tra i biocatalizzatori che vengono inibiti da detto analita, detto metodo essendo consistente in:

- a) sistemare gli elettrodi in una soluzione di misura;
- b) applicare un adeguato potenziale tra gli elettrodi;
- c) aggiungere il substrato di detto biocatalizzatore alla soluzione di misura;
- d) misurare una corrente di base;
- e) aggiungere alla soluzione il campione contenente l'analita-inibitore da determinare;
- f) misurare un cambiamento di corrente che è proporzionale alla concentrazione dell'inibitore di analita;
- g) eventualmente, sottrarre dal valore ottenuto in f) il cambiamento di corrente misurato con l'elettrodo di bianco.

16. Metodo secondo la rivendicazione 12, dove il biocatalizzatore contenuto nel sistema biosensore viene selezionato tra i biocatalizzatori che vengono inibiti da detto analita, detto metodo essendo consistente in:

- a) applicare un potenziale adeguato tra gli elettrodi;
- b) aggiungere il substrato di detto biocatalizzatore;
- c) misurare una corrente di base;
- d) mettere il sistema a contatto con il campione che contiene l'analita che deve essere determinato;
- e) misurare un cambiamento di corrente, che è proporzionale alla concentrazione dell'inibitore-analita;

eventualmente, sottrarre dal valore ottenuto in e) il cambiamento di corrente misurato con un elettrodo di bianco.

17. Uso del sistema biosensore descritto nelle rivendicazioni 1-11 per la determinazione amperometrica di analiti nella diagnostica umana e veterinaria, nei processi industriali, nel controllo qualità di alimenti e mangimi, nell'industria farmaceutica e nel monitoraggio ambientale.

(GER/pd)

Milano, li 4 Febbraio 1999

p. SAICOM S.r.l.

*97.*

il Mandatario

*Diego Pallini*

Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



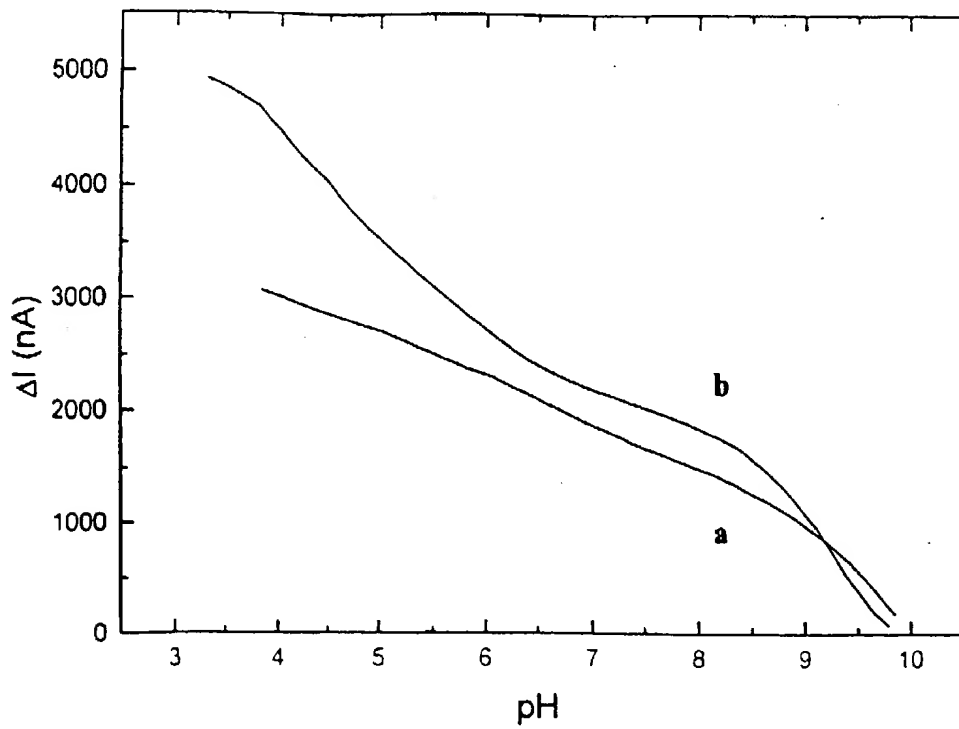


Figura 1

M199A000210

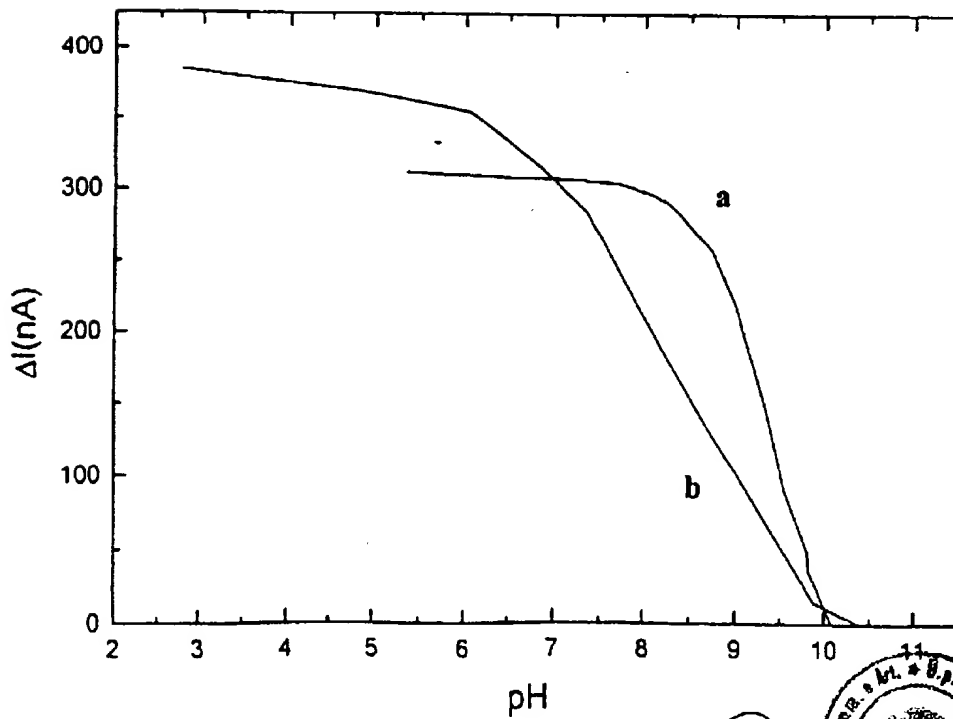
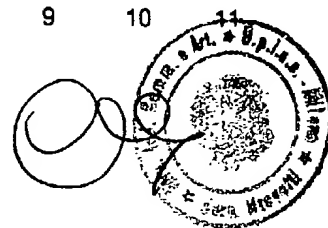


Figura 2



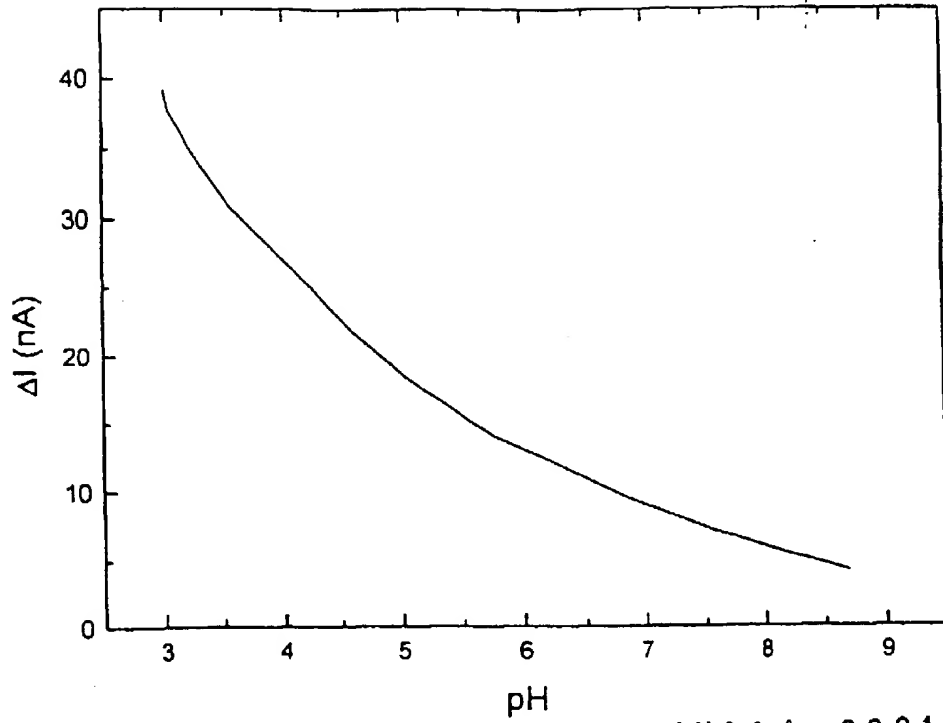


Figura 3.

MI99A000210

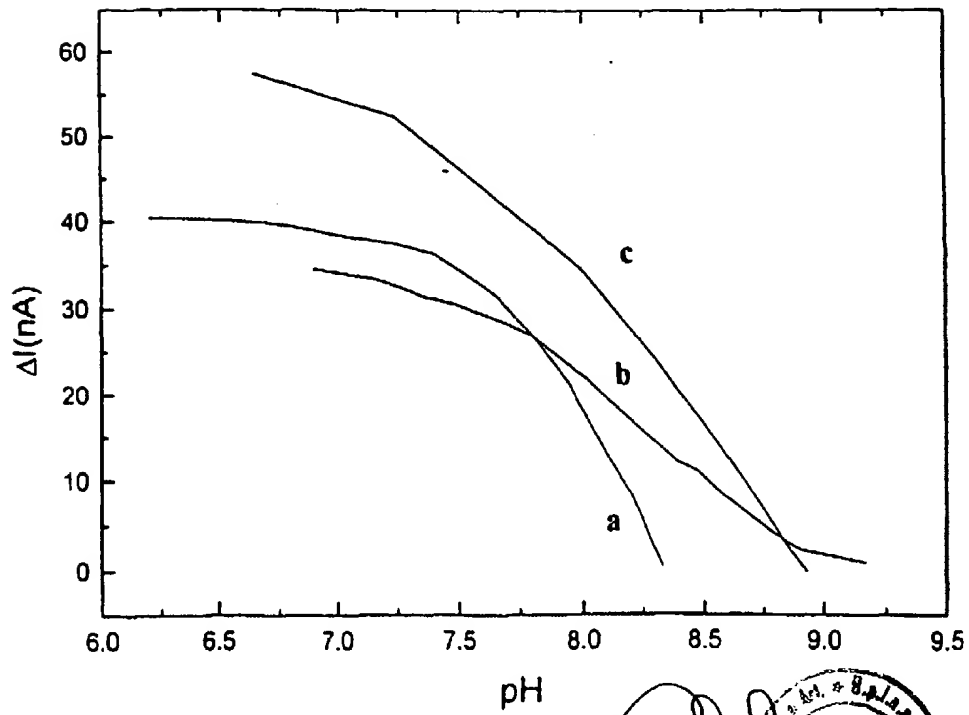
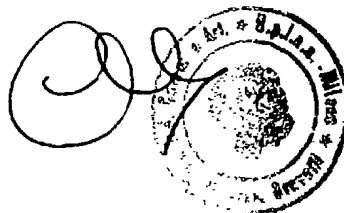


Figura 4



98.

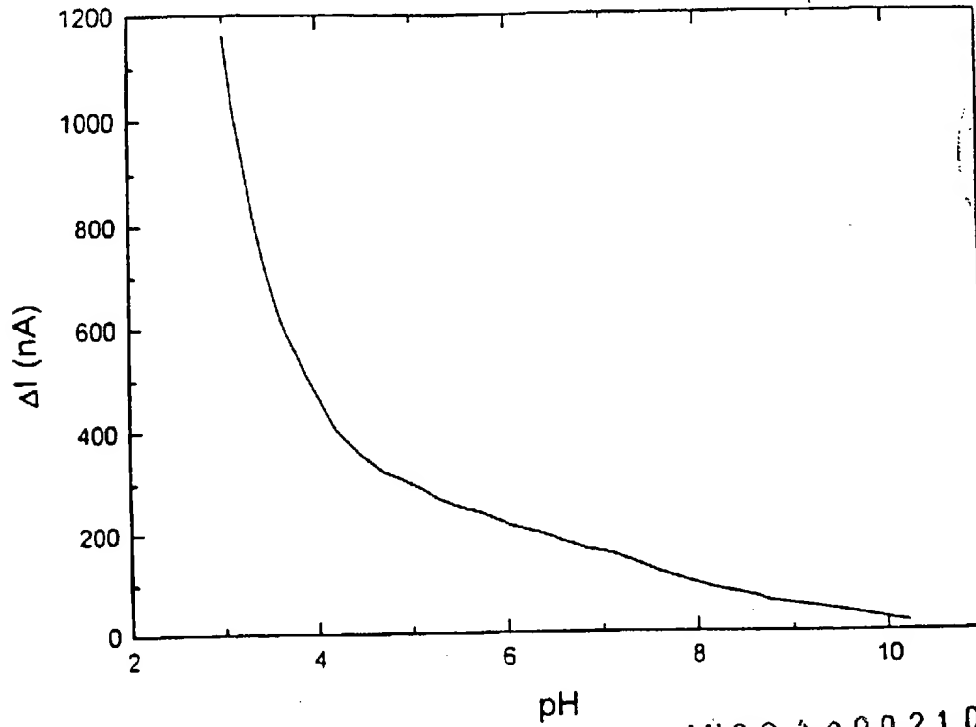
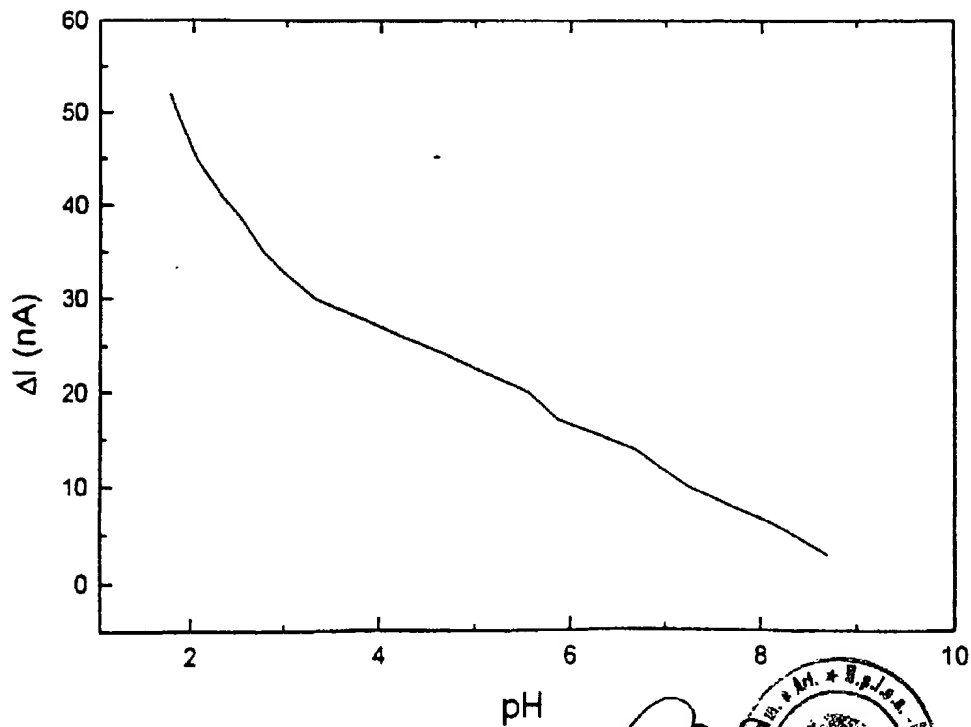
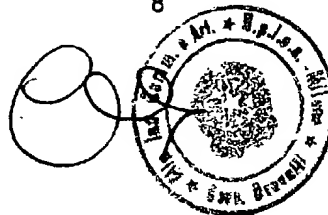


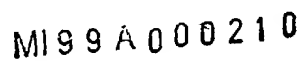
Figura 5

MI99A000210



.Figura 6





99.

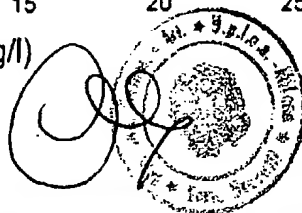


Figura 8



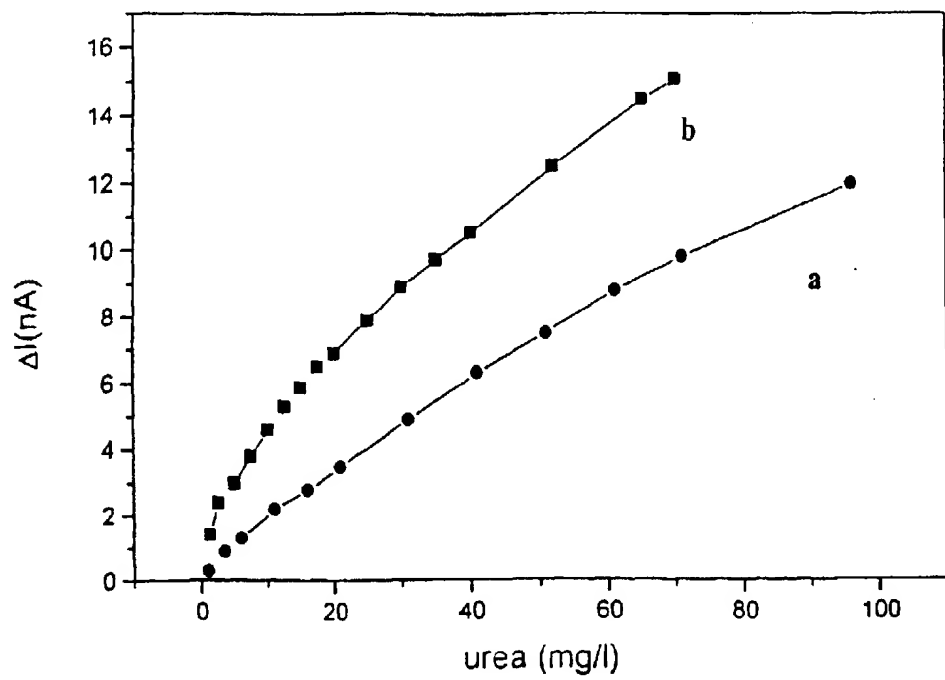


Figura 9

MI99A000210

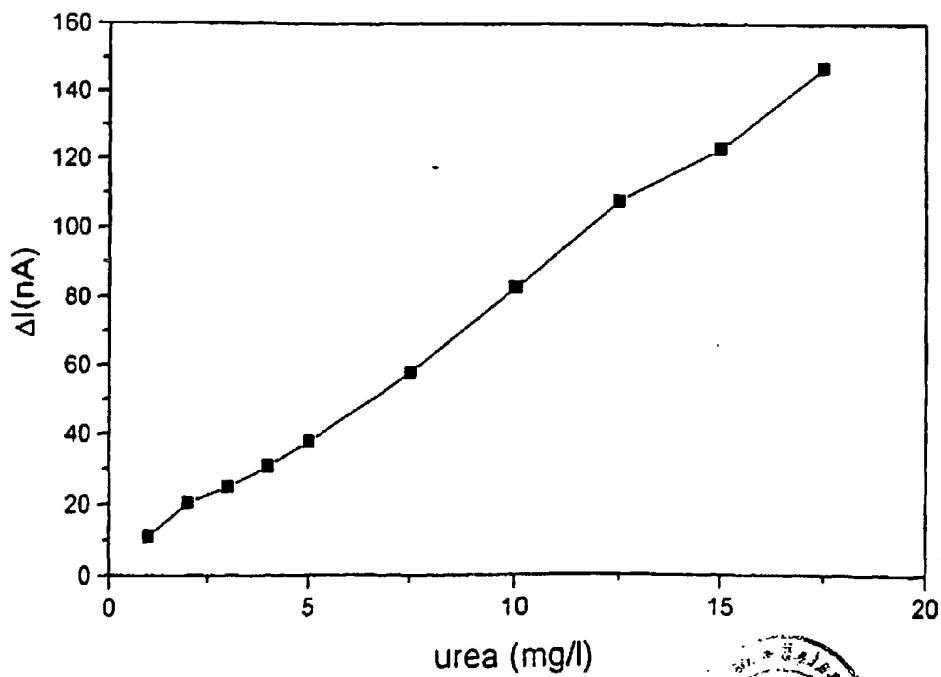
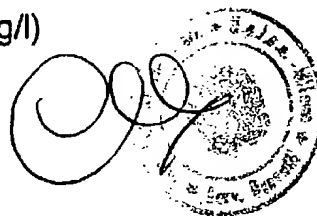


Figura 10



*F. Min*

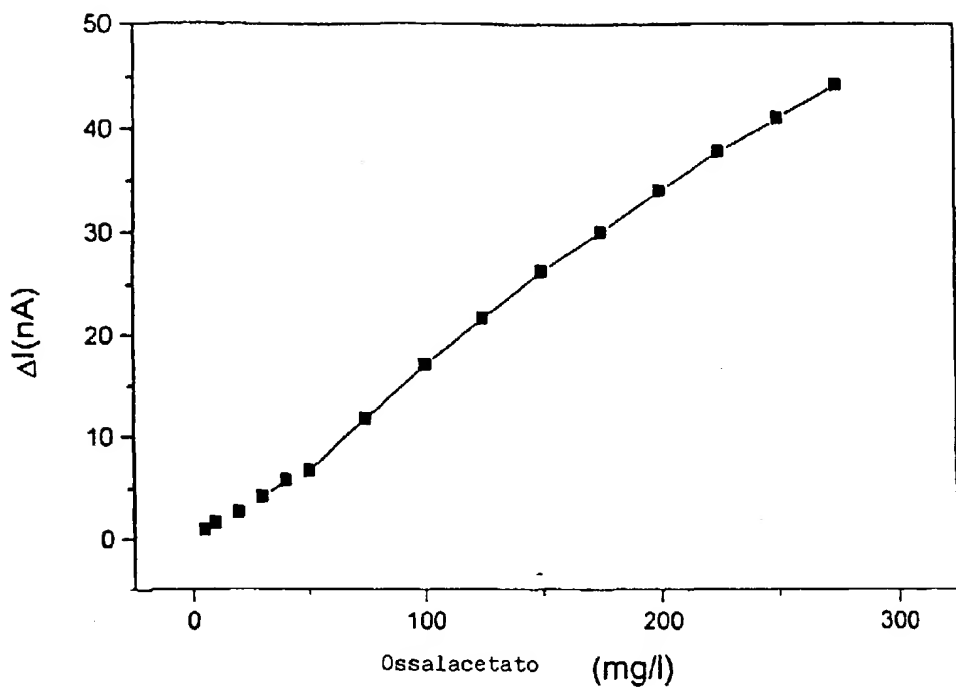


Figura 11

MI 99 A 000210

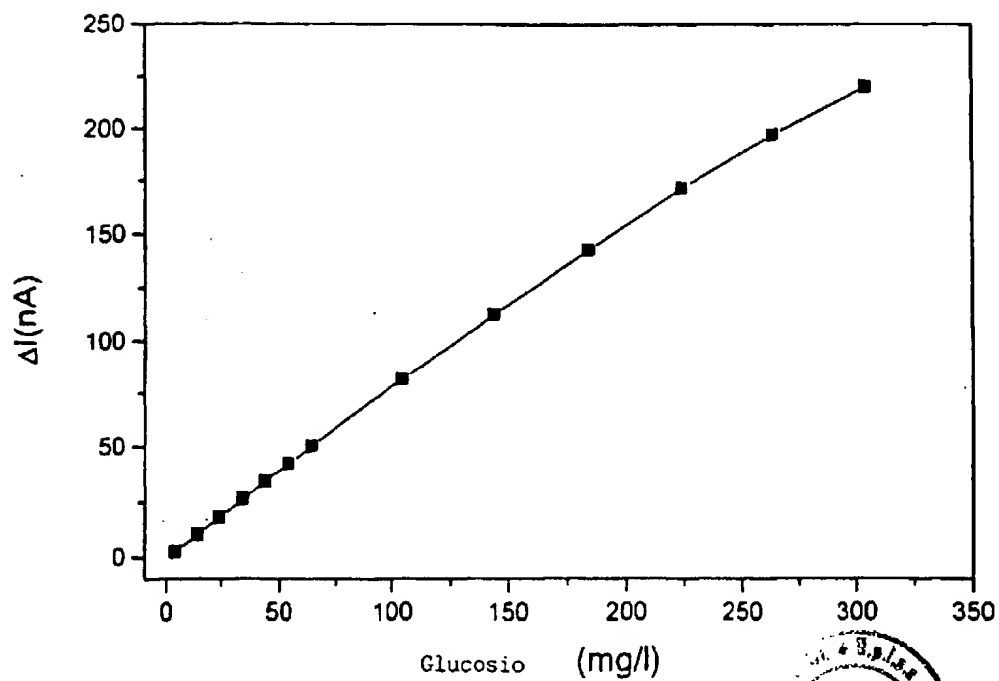
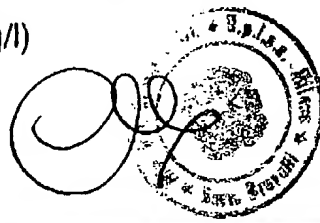


Figura 12



98.



MI 99 A 000210

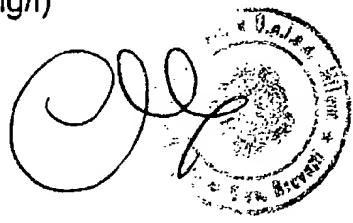


Figura 14

9.

1498 PT US

13:26 NO.002 P.1

Review

## Carbon Paste Electrodes Modified with Enzymes, Tissues, and Cells

L. Gorton\*

Department of Analytical Chemistry, Lund University, P. O. Box 124, S-221 00 Lund, Sweden

Received: February 12, 1994

Final version: April 23, 1994

## Abstract

A review is presented dealing with the use of carbon paste amperometric electrodes for electroanalytical purposes, with either the surface or the bulk being modified with biologically derived material such as enzymes, tissues, and cells. It covers virtually all the publications which have appeared from the very first enzyme-modified carbon paste electrode up to early 1994 and includes 120 references.

**Keywords:** Biosensors, Enzyme electrodes, Carbon paste

## 1. Introduction

There is a general lack of sensors based on chemical recognition as opposed to physical ones. However, in the last two decades a new sensing concept based on biological recognition was established known as biosensors, where biologically derived molecules, organelles, whole cells, or tissues are used in close contact with a transducing element [1-12]. In the presence of a substrate recognized by the biological compound, a signal is obtained from the sensing device reflecting the concentration of the substrate. In a recent article [13] the prospects and the progress of this area were evaluated and it was seen that the amperometric biosensor type (most commonly based on enzymes as the biologically derived component), as opposed to potentiometric, optical, piezoelectric, and thermal, had been the most successful and have the most promising future.

Enzymes have been used in conjunction with various electrodes for the construction of 'enzyme electrodes' for more than two and a half decades since the first amperometric enzyme electrode was reported on by Updike and Hicks in 1967 [14]. The use of amperometric enzyme electrodes is rationalized by the proposed use of the inherent selectivity shown by the enzyme to promote a selective detection of the enzyme substrate. Oxidoreductases or 'redox-enzymes' are of particular interest for the construction of amperometric enzyme electrodes since an electron transfer reaction takes place in the enzymatic conversion of the substrate. Many investigations have been performed on trying to obtain an efficient and direct electron transfer between the redox-cofactor of the oxidoreductase and an electrode at a low overpotential [1, 15-17], see also below. In most instances, however, a direct electron transfer is hindered because either steric or kinetic barriers prevail [18]. In enzymes with bound cofactors, i.e., all redox-enzymes except the NAD(P)<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases, the cofactor is buried within the enzyme structure forming an insulating layer between an electrode and the redox-cofactor of the enzyme bound to the electrode surface. For the NAD(P)<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases it is rather the very pronounced irreversible nature of both the chemical and electrochemical conversion reactions of both redox forms of the soluble cofactor at bare electrodes that prevents a direct coupling to an electrochemical transducer [7, 19-22].

To circumvent these effects, small molecules acting as charge transfer mediators can be used to shuttle the charge between the active site (redox-cofactor) of the redox-enzyme and the

electrode. The great interest shown in the construction and studies of chemically modified electrodes (CMEs) has had a great impact on recent developments in the immobilization of both active mediators and enzymes on or in electrodes [23-28]. The use of mediators and mediator modified electrodes for bioelectrochemistry in general and amperometric biosensors specifically was recently reviewed by Bartlett *et al.* [7].

In the history of enzyme electrodes, most commonly the enzyme(s) have been immobilized in a hydrophilic membrane that is, after fabrication, put in place on an electrode surface or when fabricated is cast directly onto the electrode surface [2-6, 8-12, 29]. Only about 10 years ago were enzymes intentionally immobilized directly onto the electrode surface for the first time, either through adsorption, covalent binding, or entrapment within electropolymerized membranes formed directly on the electrode surface. There has been a general belief that enzymes should be immobilized in a hydrophilic as opposed to a hydrophobic organic environment. This is rationalized by the idea that enzymes need water for their activity. However, enzymes have been shown to function in organic solvents and have been studied for purely fundamental research or organic synthesis [30-34]. Solid electrodes surface modified with enzymes or plant tissues have also been used as sensors in organic solvents saturated with an aqueous buffer, however, clearly revealing that enzymes can work analytically in organics [35-38].

Enzymes have been used in conjunction with carbon paste electrodes ever since the late 1970s, when Yao and Musha used alcohol and L-lactate dehydrogenases in solution together with a carbon paste electrode into which NAD<sup>+</sup> was covalently bound through addition of  $\alpha$ -octanaldehyde as a reagent for Schiff base formation with NAD<sup>+</sup> [39]. NADH formed as a result of the enzymatic reaction in the presence of the enzyme's substrate (ethanol or L-lactate, respectively) was directly oxidized at the carbon paste electrode at about +0.7 V vs. Ag/AgCl. With the knowledge we have today, some of the enzyme added to the contacting solution is anticipated to have been adsorbed on the electrode surface as well. Later, a series of articles have appeared and still appear, where a deliberate adsorption or localization with other means of various enzymes on the surface of carbon paste electrodes have been reported, see Tables 1 and 2 [17, 40-81].

The first reported work on carbon paste electrodes deliberately admixed with an enzyme appeared in 1988 [82], where glucose oxidase (GOO) was directly blended into the organic phase consisting of graphite powder and silicon oil. Since then,

24

L. Ques

Table 1. Amperometric glucose sensors based on glucose oxidizing enzymes (glucose oxidase (GO), glucose NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase (GDH), and glucose FAD-dependent dehydrogenase (GDH-FAD)) in combination with carbon paste and composite electrodes appearing in the art of year and whether on or in the paste.

Enzyme(s)	Composition of paste	Mediator/catalyst	$E_{app}$ (pH)	Linear response range/mM	Reference
GO (A. niger) on paste (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil, graphite powder and Nujol	HQ	+0.4–0.5 V (vs. SCE) (5.0)	0.5–15 mM 10–150 mM (depending on membrane)	[41–43]
GO (A. niger) on paste (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	1,1'-dimethylferrocene	+0.15 V (vs. SCE) (~)	0.5–15 mM	[47]
GO (A. niger) on paste (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	BQ	+0.4–0.5 V (vs. SCE) (7.0)	10–30 mM	[17, 49]
GO (P. notatum) on Sephadex CL-6B on composite (dialysis membrane)	Graphite epoxy resin	Ferrocene TTF	+0.27 V (vs. SCE) +0.15 V (vs. SCE) (6.8)	0.1–8 mM 0.1–16 mM	[54]
GO (A. niger) on paste (BSA and glutaraldehyde) (polycarbonate membrane)	Graphite powder and Nujol	TTF	+0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.5–8.0)	1–80 mM 0.003–45 mM	[57] [58]
GO (A. niger) on paste (BSA and glutaraldehyde) (polycarbonate membrane)	Graphite powder and paraffin oil	TTF-TCNQ	+0.05–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	2–60 mM	[59]
GO (A. niger) on paste (BSA and glutaraldehyde) (polycarbonate membrane)	Graphite powder and Nujol	TTF 1,1'-dimethylferrocene TTF-TCNQ	+0.2 V (vs. Ag/AgCl) +0.25 V +0.15 V (7.4)	0.1–30 mM	[60]
GO (A. niger) on paste (covalently bound to nylon net) (cellulose triacetate membrane)	Graphite powder and cellulose triacetate	Ferrocene	0.16 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	0.1–100 mM	[67]
GO (A. niger) on paste	Carbon paste (BAS, CP-C)	Ptium black cobalt phthalocyanine	+0.4 to +0.7 V (vs. Ag/AgCl) (-)	0.01–7 mM	[72]
GDH-FAD on paste	Graphite powder and paraffin oil	HQ, NMP <sup>+</sup> , 1-methoxy-NMP <sup>+</sup> , DCPIP, ferricyanide	-	-	[17]
GO (A. niger) mixed into paste	Graphite powder and silicon oil	None	+0.9 V (vs. Ag/AgCl) (6.5)	0.5–30 mM	[82]
GO (A. niger) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Poly(BQ-siloxane)	- (7.0)	-	[163]
GO (A. niger) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Methyl(ferrocenylethyl)-siloxane homopolymer, methyl(ferrocenylethyl)-dimethyl-siloxane copolymer	+0.3–0.4 V (vs. SCE) (7.0)	1–5 mM	[84]
GO (A. niger) mixed into paste (Bastman AQ 29D membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Poly(methyl, $\beta$ -ferrocenylethylsiloxane)	+0.3 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	0.5–20 mM	[89]
GO (A. niger) mixed into paste	Graphite powder, mineral oil, and stearic acid	Ferrocene monocarboxylic acid, 1,1'-dimethylferrocene, <i>n</i> -perylferrocene	+0.3 V (vs. Ag/AgCl) (6.5)	1–6 mM	[90]
GO (A. niger) mixed into composite	Graphite epoxy resin (Dylon, grade RX)	1,1'-dimethylferrocene	+0.5 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	0.5–2.5 mM	[97]
GO (A. niger) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Poly( <i>o</i> -xylylene) poly( <i>p</i> -xylylene) N,N'-di(4-nitrobenzyl)pyrrolene	-0.1 to -0.2 V (vs. SCE) (7.0)	0.1–1 mM	[94, 106]

Electroanalysis, 1995, 7, No. 1

## Modified Carbon Paste Electrodes

25

Table 1. Continued

Enzyme(s)	Composition of paste	Mediator/catalyst	$E_{red}$ (V)	Linear response range/mM	References
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Different ferrocene and diethylferrocene siloxane polymers	+0.3 to +0.4 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	0.1–10 mM	[95, 96, 103, 116]
GOD ( <i>A. niger</i> ) and HRP mixed into paste	Graphite powder and mineral oil	Ferrocenyls in solution	–0.1 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	–	[97, 101]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and mineral oil		+1.0 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	0.5–1.5 mM	[102]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil		+1.1 V (vs. SCE) (7.0)	1–50 mM	[107]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	1,1'-dimethylferrocene	+0.16 V (vs. SCE) (7.0)	20–90 mM	[107]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Heptyldimethylamino-methylferrocene	+0.6 V (vs. SCE) (7.0)	0.5–10 mM	[108]
GOD mixed into paste (Fassina AQ290 membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Methylene blue	+0.1 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	0.15–70 mM	[91, 109, 110]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Different ferrocene-poly(ethylene oxide) polymers	+0.1–0.3 V (vs. SCE) (7.0)	0.1–10 mM	[105, 116]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Ferrocene	+0.7 V (vs. SCE) (7.0)	1–30 mM	[111]
GOD ( <i>A. niger</i> )-PEG (or GOD) mixed into paste	Carbon paste (BAS, CP-O)	1,1'-dimethylferrocene	+0.4 V (vs. Ag/AgCl) (5.0)	0.1–10 mM	[72, 114, 115]
GOD ( <i>A. niger</i> ) and HRP covalently bound and crosslinked into paste	Carbodiimide-crosslinked graphite powder, phenylmethylsiloxane oil, and glutaraldehyde	Direct electron transfer electrode-HRP	–0.03 V (vs. Ag/AgCl) (5.0)	1–100 $\mu$ M	[117]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and Nujol	TCNQ	+0.22 V (vs. SCE) (7.0)	0.5–20 mM	[122]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into composite	Graphite powder and poly(vinyl chloride)	Ferrocene monocarboxylic acid (in solution)	+0.3 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	0.32–1 mM	[126]
GOD ( <i>A. niger</i> )-PEG mixed into paste	Carbon paste (BAS, CP-O)	Direct electron transfer	0 V (vs. Ag/AgCl) (5.5)	10–50 mM	[127, 164]
GDI mixed into paste (Eastman AQ29D membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Different colidine blue O polymers	0 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	7–0.5 mM (no membrane) 7–5 mM (with membrane) (25 $\mu$ M–1 mM NADH, no membrane)	[128, 134]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste (Eastman AQ 55D, Nafion membrane, asolein, phosphatidyl choline, or cholesterol)	Graphite powder and paraffin oil	1,1'-dimethylferrocene	+0.45 V (vs. SCE) (7.0)	1–30 mM	[132]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into composite	Graphite powder and epoxy resin (Epo-Tek H77)		+1.15 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	10 $\mu$ M–30 mM	[135]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Ferrocene containing siloxane ethylene oxide copolymer	+0.3 V (vs. SCE) (7.0)		[131]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into composite	Colloidal graphite emulsion	Cobalt phthalocyanine	+0.7 V (vs. SCE) (6.0)	0.5–3 mM	[137]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into composite	Colloidal graphite emulsion	Vinylferrocene	+0.25 V (vs. SCE) (7.5)	0.01–0.5 mM	[138]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Ruthenium dispersed graphite powder and mineral oil	Ruthenium	–0.15 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	1–15 mM	[140]

Electroanal. 1995, 7, No. 1

26

L. Govi

Table 1. Continued

Enzyme(s)	Composition of paste	Mediator (catalyst)	$E_{redox}$ (pH)	Linear response range (mM)	Reference
UOD ( <i>A. niger</i> ) and tyrosinase mixed into paste	Platinized graphite powder and mineral oil		+0.4 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	Elimination of 95% of 0.2 mM acetaminophen	[141]
GOD ( <i>A. niger</i> ) covalently bound to graphite in paste	Carbodiimide-activated graphite powder, graphite powder, and granular Teflon		+0.9 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	0.2–1 mM	[157]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder and mineral oil (surface-activated in slightly alkaline medium)	BQ	+0.15 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	20–70 mM	[159]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder, fumed silica, and mineral oil	None	+0.6 V (vs. Ag/AgCl) (oxidation) –0.2 V (vs. Ag/AgCl) (reduction)		[158]
		1,1'-Dinaphthylferrocene	+0.3 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)		
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into composite	Graphite powder, epoxy resin (Epo-Tek H77), gold and palladium powder	Gold and palladium	+0.9 V (vs. Ag/AgCl) (9.0)	0.01–2 mM	[136]
GOD ( <i>A. niger</i> ) mixed into paste	Graphite powder, paraffin or phenylmethylsiloxane oil, urethane	1-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)-4-(4-morpholinyl)benzotriazole	+0.125 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	1–16 mM	[160]
GOD ( <i>A. niger</i> ) crosslinked onto graphite in paste	Graphite powder, glutaraldehyde, paraffin oil	Meldola blue	–0.1 V (vs. SCE) (7.4)	1–25 mM	[161]
GOD ( <i>P. chrysogenum</i> ) mixed into paste	Graphite powder and paraffin oil	Methylviologen	+0.063 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	1–15 mM	[161, 162]

immobilization of an enzyme into an organic phase composite electrode (carbon paste, carbon cement, carbon epoxy resins) has been an increasingly popular way for the construction of enzyme electrodes. As with other studies on enzyme electrodes, the most common substrate focused on has been glucose rationalized by the obvious and great interest in measuring this compound.

However, today one can see that a wide variety of different enzymes, mainly oxidoreductases, have been immobilized in carbon paste electrodes, see Tables 1 and 3 [20, 75–77, 83–162]. To differentiate between the various groups of oxidoreductases used in conjunction with carbon paste electrodes, a brief compilation follows below to facilitate the understanding of the major groups of these enzymes used in combination with amperometric biosensors.

## 2. Dehydrogenases

The dehydrogenases are characterized by their enzyme-catalyzed reactions being independent of and insensitive to

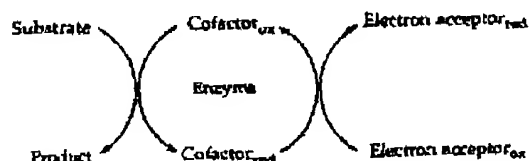


Fig. 1. Reaction sequence for an oxidation reaction catalyzed by a dehydrogenase.

Electroanalysis, 1995, 7, No. 3

molecular oxygen. Figure 1 shows the overall summarized reaction cycle exemplified with an oxidation reaction of a substrate (S) to a product (P). The reduced form of the cofactor needs the presence of an electron and a proton acceptor other than molecular oxygen, see below for oxidases, to recycle the enzyme. One can differentiate between different groups of dehydrogenases; those with bound cofactors and those dependent on a soluble cofactor acting as a cosubstrate in the enzyme cycle. The group depending on a bound cofactor can be further subclassified, e.g., into flavoproteins having FAD or FMN as cofactor or the relatively recently discovered pyrrolo-quinoline quinone (PQQ) dependent dehydrogenases [17, 165–168]. Examples of flavoprotein dehydrogenases are cytochrome  $b_2$  and diaphorase, both of which also contain additional redox-active functionalities (heme-groups). The PQQ-dehydrogenases have attracted a lot of interest in biosensor configurations lately partly because of their insensitivity to molecular oxygen in contrast to the oxidases, the major group of redox enzymes used for these kind of studies, see below. Direct electron transfer between the dehydrogenases and electrodes has been confirmed in an ever growing number of publications, see below. However, the major route of coupling these enzymes to electrochemical transducers has been through the use of redox mediators, shuttling the electrons most often from the reduced form of the enzyme to the electrode [7].

All the various dehydrogenases dependent on either nicotinamide adenine dinucleotide ( $NAD^+$ ) or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $NADP^+$ ) constitute the largest group of redox enzymes known today ( $\approx 450$  to 500). This is not reflected by the number of publications making use of these enzymes in amperometric biosensor configurations. Three major drawbacks for these enzymes constitute the reasons for this. The first reason is that these enzymes rely for activity on a

07/07/2004 10:40

9498556371

37

Table 2. Enzyme surface-modified carbon paste and composite electrodes for substrates other than glucose appearing in alphabetic order.

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator(s)/electrolyte	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
Alcohol PQQ-dehydrogenase (EC 1.1.99.8)	Graphite powder and paraffin oil	Ethanol	BQ, NMP <sup>+</sup> , 1-methoxy-NMP <sup>+</sup> , DCPIP, ferricyanide	-	-	[17]
Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (nitrocellulose membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Ethanol			+0.7 V (vs. Ag/AgCl) (-)	[44]
Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)/diaphorase (EC 1.6.99.-) (dialysis membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Ethanol	Vitamin K <sub>1</sub>	1-5 mM	-0.15 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	[33]
Aldose PQQ-dehydrogenase (Eusimul AQ2913)	Graphite powder and paraffin oil	Glucose, xylose	1,1'-dimethylferrocene (ferrocene, ferrocene dicarboxylic acid, ferrocene monocarboxylic acid, tert-pentylferrocene, butylferrocene, ferrocene acetic acid, ferrocene carboxaldehyde, dimethylferrocene dicarboxylate, hydroxymethylferrocene, TCNQ, duroquinone)	0.1-1.5 mM glucose 1-7 mM xylose	+0.2 V (vs. Ag/AgCl) (6.5)	[76, 81]
Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) (membrane)	Graphite powder and Nujol	p-nitrophenyl phosphate		20-120 $\mu$ M	+0.8 V (vs. Ag/AgCl) (9.0)	[68]
L-Amino acid oxidase (EC 1.4.3.2) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	L-Leucine	1,1'-dimethylferrocene	1-2 mM	+0.22 V (vs. Ag/AgCl) (7.8)	[45]
Ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Ascorbate oxidation			+0.5 V (vs. Ag/AgCl) (4.5)	[56, 55]
Cholinesterase (EC 3.1.1.-) (glutaraldehyde and polyamide net)	Graphite powder and paraffin oil	Butyrylcholine (inhibited by organophosphate and carbamate pesticides)	Cobalt phthalocyanine	2 $\mu$ M-0.36 mM butyrylcholine	+0.4 V (vs. Ag/AgCl) (8.9)	[70]
Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) (nylon net)	Carbon black and epoxy resin	Paraoxon, heptachlor epoxide carbaryl (acetylcholine butyrylcholine)	Cobalt phthalocyanine	10 <sup>-3</sup> -0.032 g l <sup>-1</sup> paraoxon, heptachlor 10 <sup>-1</sup> -0.1 g l <sup>-1</sup> malathion, carbaryl (0.01-1 mM acetyl- and butyrylcholine)	+0.3 V (vs. Ag/AgCl) (7.3)	[74]
Carbon monoxide receptor oxidoreductase (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	CO	1,1'-dimethylferrocene	7-60 $\mu$ M CO	+0.16 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[40]
Diaphorase (EC 1.8.1.4) (EC 1.6.99.-)*	Graphite powder and paraffin oil	NADH	Ferrocene, BQ, catechol, p-aminophenol, ferricyanide, DCPIP, ascorbic acid sulfonate, vitamin K <sub>1</sub> , flavins	7-6 mM (with vitamin K <sub>1</sub> )	-0.2 to +0.3 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	[53]
Diaphorase (EC 1.8.1.4) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	NADH, NADPH	Direct electron transfer	5-20 $\mu$ M NADH	0 V (vs. Ag/AgCl) (7.5-10.5)	[73]

Electroanalysis 1995, 7, No. 1



28

Table 2. Continued

L. Gortz

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator/catalyst	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
Fructose PQQ-dehydrogenase (EC 1.1.99.11) (dialysis membrane) (ascorbate oxidase, EC 1.10.3.3) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Fructose (ascorbate elimination)	BQ		+0.5 V (vs. Ag/AgCl) (4.3)	[56]
Fructose PQQ-dehydrogenase (EC 1.1.99.11) (dialysis membrane) (ascorbate oxidase, EC 1.10.3.3) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Fructose (ascorbate elimination)	Direct electron transfer	0.2–0.5 mM	+0.5 V (vs. Ag/AgCl) (4.5)	[65]
Fructose PQQ-dehydrogenase (EC 1.1.99.11)	Heat-treated graphite powder, paraffin oil, and PEI	Fructose	Direct electron transfer	—	–0.1 to +0.4 V (vs. Ag/AgCl) (4.5)	[73]
Galactose oxidase (EC 1.1.3.9) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Galactose	1,1'-dimethylferrocene	7–1.5 mM	+0.22 V (vs. Ag/AgCl) (6.5)	[45]
D-Glucosate FAD-dehydrogenase (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	D-Glucosate	BQ ubiquinone			[17, 46, 48]
D-Glucosate FAD-dehydrogenase	Graphite powder and paraffin oil	D-Glucosate	Direct electron transfer	7–5 mM	+0.1 V (vs. Ag/AgCl) (5.0)	[17, 50]
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) diaphorase (EC 1.8.1.4) (dialysis membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Glucose-6-phosphate	Vitamin K <sub>3</sub>	0.1–2 mM	–0.15 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	[53]
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) and diaphorase (EC 1.8.1.4) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	(Glucose-6-phosphate) NADH, NAD <sup>+</sup>	2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K <sub>3</sub> )	1–100 $\mu$ M NADH	0 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	[63]
L-Glutamate oxidase (EC 1.4.3.11) (glutaredhyde + BSA)	Graphite powder and mineral oil	L-Glutamate	TPP	2.6 $\mu$ M–0.8 mM	+0.15 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[78]
Glycerol dehydrogenase (EC 1.1.99.-)	Graphite powder and paraffin oil	Glycerol	BQ, NMP <sup>+</sup> , 1-methoxy-NMP <sup>+</sup> , DCTP, ferrocyanide	—	—	[17, 51]
Glycerol dehydrogenase (EC 1.1.1.6) and diaphorase (EC 1.1.99.-) (dialysis membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Glycerol	Vitamin K <sub>3</sub>	0.5–3 mM	–0.15 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	[53]
Glycolate oxidase (EC 1.1.3.15) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Glycolate	1,1'-dimethylferrocene	7–2.5 mM	+0.22 V (vs. Ag/AgCl) (8.3)	[45]
L-Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) and diaphorase (EC 1.1.99.-) (dialysis membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	L-Lactate	Vitamin K <sub>3</sub>	0.5–5 mM	–0.15 V (vs. Ag/AgCl) (8.5)	[53]

Electroanalysis, 1995, 7, No. 1

Table 2. Continued

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator/catalyst	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
Nucleoside oxidase (BC) (dialysis membrane) (5'-nucleosidase) (EC 3.1.3.5) in solution	Graphite powder and paraffin oil	Inosine, thymidine, cytidine, adenosine, uridine, deoxycytosine, deoxyadenosine, (nucleosides)	BQ	0.025–0.5 mM inosine	–0.1 V (vs. Ag/AgCl) (6)	[64] (79)
Oligosaccharide dehydrogenase (EC 1.1.99.-) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Maltosaccharides	BQ	1 $\mu$ M–10 mM maltose	+0.5 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[17, 52]
Oligosaccharide dehydrogenase (EC 1.1.99.-) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Xylose, glucose, galactose, mannose, lactose, maltose, maltotriose, maltotetraose, $\alpha$ -maltose	BQ	0.1–30 mM glucose 0.1–30 mM maltose 0.1–30 mM maltotriose 0.1–30 mM maltotetraose	+0.5 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[53, 61]
Polyamine dehydrogenase (EC 1.1.99.-)	Graphite powder and paraffin oil	Putrescine	BO, NMP <sup>+</sup> , 1-methoxy-NMP <sup>+</sup> , UCPIP, ferricyanide			[17, 51]
Tyrosinase (mushrooms) (EC 1.14.18.1) (dialysis membrane)	Graphite powder and paraffin oil carbon black and mineral oil	Phenol, catechol, 4-oxetol, hydroquinone, pyrogallol, L-tyrosine, tyramine, 3,4-dihydroxy-phenylalanine, chlorogenic acid		0.01–100 $\mu$ M phenol, catechol	–0.1 V (vs. Ag/AgCl) (6.0–6.5)	[71]
Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22) (membrane)	Graphite powder and Nujol	Hypoxanthine, xanthine		3–60 $\mu$ M	+0.4 V (vs. Ag/AgCl) (7.2)	[66, 68]
Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22)	Graphite powder and mineral oil	Allopurinol (xanthine, hypoxanthine)		0.1–2 $\mu$ M allopurinol (1–20 $\mu$ M xanthine 1–5 $\mu$ M hypoxanthine)	0 V (vs. SCE) (3.3)	[62]
Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22) (cellulose triacetate)	Graphite powder and paraffin oil	Hypoxanthine	Hydroxymethylferrocene	0.6–700 $\mu$ M	0.29 V (vs. Ag/AgCl) (7.8)	[69]

soluble cofactor acting as a cosubstrate and as such it needs to be added to the sensing system separately. The cofactor is expensive and for practical use, especially for routine analysis, it may turn up to be much too costly to be continuously added. The second reason is that the formal potential ( $E^0$ ) of the  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  redox couple is low having a value at pH 7.0 of  $-560$  mV vs. SCE [19], meaning that  $\text{NAD(P)}^+$  has a very low oxidizing power compared with the  $E^0$  values of most of the substrates for the dehydrogenases. Most commonly an  $\text{NAD(P)}^+$ -dependent dehydrogenase is used analytically to oxidize a substrate for the production of a stoichiometric amount of  $\text{NAD(P)H}$ , which is then measured. To be able to use these systems analytically, a second reaction step is thus necessary to push the equilibrium to the product side. This can be achieved in a number of different ways. A second purely chemical or enzymatic step can be coupled to the dehydrogenase step, in which either the initial  $\text{NADH}$  produced or the product is consumed. One way to accomplish this would be to

electrochemically oxidize the  $\text{NADH}$  formed and thus also measure the current as a response signal proportional to the substrate concentration [39, 44, 85, 120, 139]. However, and here we now deal with the third obstacle with the  $\text{NAD(P)}^+$ -dependent dehydrogenases, the conversion of both redox forms of the cofactor on naked electrodes is subjected to very pronounced irreversible electrochemistry and for high  $\text{NADH}$  concentrations ( $> 0.1$  mM) further complicated by side reactions and risk for electrode fouling [7, 17, 19–22]. For sensor making only really the electrochemical oxidation of  $\text{NADH}$  is of interest, since the low  $E^0$  of the  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  redox couple is much too low to proceed, even if there were an efficient mediator promoting this reaction, without the risk for interference to the response signal from contemporaneous electrochemical reduction of molecular oxygen. Much work has therefore been devoted to finding good mediators catalyzing the electrochemical oxidation of  $\text{NAD(P)H}$  within the optimal potential range and with enzymatically active  $\text{NA(XP)}^+$  as the

30

L. Garza

Table 3. Bulk enzyme-modified carbon paste and composite electrodes for substrates other than glucose appearing in alphabetical order.

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator/catalyst	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
Acetylcholine esterase (EC 3.1.1.7) and choline oxidase (EC 1.1.3.17)	Graphite powder and paraffin oil	Acetylcholine (choline)	Perrhodine polymer	1–60 $\mu$ M	+0.35–0.3 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[116, 143]
Acetylcholine esterase (EC 3.1.1.7) and choline oxidase (EC 1.1.3.17)	Graphite powder and paraffin oil	Acetylcholine, choline	TTF	0.5–400 $\mu$ M acetylcholine	–0.1 to +0.2 V (vs. SCE) (7.0)	[104]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Carbon paste (Metrohm), NAD <sup>+</sup>	Ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol		10–130 mM ethanol	+0.7 V (vs. Ag/AgCl) (7.5–8.5)	[85]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Graphite powder, paraffin oil, NAD <sup>+</sup> , and PEI	Ethanol	Toluidine blue polymer	50 $\mu$ M–1 mM	+0.1 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[75, 77, 130]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (Bazman AQ29D membrane)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Ethanol	Brilliant orange blue derivative	Nonlinear response	0 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[91, 110]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Graphite epoxy resin (Dylon) and NAD <sup>+</sup>	Ethanol, allyl alcohol, 1-propanol, 1-butanol, 2-propanol		0–4.4 mM ethanol 0–5.8 mM allyl alcohol 0–8.3 mM 1-propanol 0–11.7 mM 1-butanol 12–32 mM 2-propanol	+0.7 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[120]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Ruthenium-activated carbon, graphite powder, mineral oil, and NAD <sup>+</sup>	Allyl alcohol, ethanol, 1-propanol, 1-butanol		1.7–17 mM ethanol	+0.6 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[139]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Graphite powder, paraffin oil, and NAD <sup>+</sup>	Ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-amy alcohol, 2-butanol	Methylene green	0.04–0.0 mM ethanol 0.05–7.5 mM 1-propanol 0.1–8.0 mM 2-propanol 0.4–8.5 mM 1-butanol 0.4–6.5 1-amy alcohol 1.0–16.5 mM 2-butanol	0 V (vs. Ag/AgCl) (8.3)	[144]
Yeast alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	Rehydrated fumed silica, graphite powder, mineral oil, and NAD <sup>+</sup>	Ethanol		Nonlinear response	+0.58 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[155]
Alcohol oxidase ( <i>Pichia pastoris</i> ) (EC 1.1.3.13) and HRP (EC 1.1.1.7)	Graphite powder, paraffin oil, and PEI	Ethanol	Direct electron transfer (HRP electrode)	10 $\mu$ M–0.5 mM	–0.85 V (vs. Ag/AgCl) (8.0)	[147]
Alcohol oxidase ( <i>Candida boidinii</i> ) (EC 1.1.3.13) and HRP (EC 1.1.1.7)	Carbon (unide-activated, heat-treated) graphite powder, phenyl methyl silicon oil, glutaraldehyde, and PEI	Hydrogen peroxide, methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol	Direct electron transfer (HRP electrode)	8–500 $\mu$ M hydrogen peroxide 10 $\mu$ M–2 mM methanol, ethanol	–0.85 V (vs. Ag/AgCl) (7.5)	[117, 146, 149–152]
Alcohol oxidase ( <i>Candida boidinii</i> ) (EC 1.1.3.13) and HRP (EC 1.1.1.7) alcohol oxidase ( <i>Pichia pastoris</i> ) (EC 1.1.3.13) and HRP (EC 1.1.1.7)	Heat-treated graphite powder, phenylmethyl silicon oil, and PEI	Hydrogen peroxide, methanol, ethanol, 2-butanol, allyl alcohol, 2-chloroethanol, formaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, dihydroxyacetone, propionic acid, butyric acid, inositol triphosphate	Direct electron transfer (HRP-electrode)		–0.85 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[76]

Electroanalysis, 1998, 7, No. 1

Table 3. Continued.

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator/catalyst	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
D-Amino acid oxidase (EC 1.4.3.3) and HRP (EC 1.11.1.7)	Heat-treated graphite powder, paraffin oil and PEI, quaternized PEI, ethoxylated PEI, Catquat 734, chitosan, glutamine, gentamicin or neomycin	Hydrogen peroxide, D-alanine, D-valine, D-leucine, D-isoleucine, D-serine, D-aspartic acid, D-glutamic acid, D-lysine, D-histidine, D-arginine, D-phenylalanine, D-tryptophan, D-methionine, D-proline	Direct electron transfer (HRP-electrode, ARP-electrode)	5 $\mu$ M–1 mM hydrogen peroxide 0.1–14 mM D-phenylalanine	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (8.0)	[76, 129, 147, 148]
L-Amino acid oxidase (EC 1.4.3.2) and HRP (EC 1.11.1.7)	Heat-treated graphite powder, paraffin oil, and PEI	All 20 common L-amino acids	Direct electron transfer (HRP-electrode)	20–100 $\mu$ M	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (7.5)	[117, 129, 148, 150]
Ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3)	Graphite powder and paraffin oil	Ascorbate	Methylene green, Mordola blue		+0.094 V (vs. SCE) (5.6 or 7.0)	[157]
Bilirubin oxidase (EC 1.3.3.5) and HRP (EC 1.11.1.7)	Graphite epoxy resin (Dylon, grade RX)	Bilirubin	Ferrocyanide in solution	4–100 $\mu$ M	–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[165]
Diaphorase (EC 1.5.1.4)	Graphite powder and paraffin oil	NADH	Methylene green, Mordola blue	30–800 $\mu$ M (Mordola blue)	0 V (vs. SCE) (7.0)	[153]
L-Glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3)	Octadecylamine-treated carbon paste (Metrohm)	L-Glutamate	Ferrocyanide, NMP <sup>+</sup> , NAD <sup>+</sup> (in solution)	50 $\mu$ M–1.3 mM	+0.32 V (vs. SCE) (8.0)	[118]
L-Glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3)	Carbon paste (Metrohm, BA 207C)	L-Glutamate	NMP <sup>+</sup> , NAD <sup>+</sup> (in solution)	1–500 $\mu$ M L-glutamate (0.1 $\mu$ M–1 mM NADH)	+0.05 V (vs. Ag/AgCl) (+0.2 V vs. NMP <sup>+</sup> ) (7.4)	[137]
L-Glutamate oxidase (EC 1.4.3.11) and HRP (EC 1.11.1.7)	Heat-treated graphite powder, paraffin oil, and PEI	Hydrogen peroxide, L-glutamate	Direct electron transfer (HRP-electrode)	10 $\mu$ M–1 mM	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[75, 76]
L-Glutamate oxidase (EC 1.4.3.11)	Graphite powder and paraffin oil	L-Glutamate	Ferrocene siloxane and ethylene oxide polymers	0.01–0.12 mM	+0.3–0.4 V (vs. SCE) (–)	[116]
Glycolate oxidase (EC 1.1.3.15)	Graphite powder and paraffin oil	Glycolate	Different ferrocene and dimethylferrocene siloxane polymers	0.1–4 mM	+0.3 V (vs. SCE) (8.0)	[91, 96]
L-Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	Graphite powder and paraffin oil	L-Lactate	Toluidine blue O polymer	–	0 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[78]
L-Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	Rehydrated fumed silica, graphite powder, mineral oil, and NAD <sup>+</sup>	L-Lactate	–	Nonlinear response	+0.58 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[155]
L-Lactate monooxygenase (EC 1.13.12.4)	Graphite powder and paraffin oil	L-Lactate	Dimethylferrocene siloxane polymer	–	+0.3–0.4 V (vs. SCE) (–)	[96]
L-Lactate oxidase (EC 1.1.3.2) and ARP (EC 1.11.1.7)	Heat-treated graphite powder, paraffin oil, and PEI	Hydrogen peroxide, L-Lactate	Direct electron transfer (ARP-electrode)	1–1000 $\mu$ M hydrogen peroxide, L-Lactate	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[75]
L-Lactate oxidase (EC 1.1.3.2)	Graphite powder and paraffin oil	L-Lactate	Ferrocene, 1,1'-dimethylferrocene, N,N-dimethyl-unsaturated ferrocene, or Mordola blue	2–2.5 mM (Mordola blue)	+0.03–0.4 V (vs. SCE) (8–9)	[124]
L-Lactate oxidase (EC 1.1.3.2)	Graphite powder and paraffin oil	L-Lactate	Methylene green, methylene blue	2–8 mM	+0.05–0.6 V (vs. SCE) (7.0)	[154]
HRP (EC 1.11.1.7)	Graphite epoxy resin (Dylon, grade RX)	Hydrogen peroxide	Ferrocyanide in solution	0.1–1 mM	–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[92]

Electroanalysis 1995, 7, No. 1

32

Table 3. Continued.

L. Gorton

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator/co-catalyst	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
HRP (EC 1.11.1.7) (Nafion membrane)	Graphite powder and paraffin oil	Hydrogen peroxide	Ferrocene	0.1–10 $\mu$ M	0 V (vs. Ag/AgCl) (8.0)	[112]
HRP (EC 1.11.1.7)	Carbodiimide-activated graphite powder, phenylmethyl silicon oil, and glutaraldehyde	Hydrogen peroxide	Direct electron transfer	5–60 $\mu$ M	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (6.0)	[120]
HRP (EC 1.11.1.7) or ARP (EC 1.11.1.7)	Graphite powder and silicon grease or graphite epoxy resin (Dylon, grade RX)	Hydrogen peroxide, cumene peroxide, cumene peroxide, <i>t</i> -butyl peroxide, triphenylmethyl peroxide, lauryl peroxide, <i>t</i> -butyl peroxybenzoate, <i>tert</i> -amyl peroxybenzoate	Direct electron transfer $\alpha$ -phenylacetaminine (in buffer)	0.5–20 $\mu$ M hydrogen peroxide 3.1–300 $\mu$ M butanone peroxide, 30–400 <i>t</i> -butyl peroxybenzoate, 3.3–7 $\mu$ M cumene peroxide, 10–7 $\mu$ M <i>t</i> -butyl hydroperoxide	–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[100, 113]
HRP (EC 1.11.1.7) or ARP (EC 1.11.1.7)	Graphite powder and silicon grease graphite epoxy resin (Dylon)	Hydrogen peroxide, cumene peroxide, 2-butanone peroxide, <i>t</i> -butyl peroxide, <i>t</i> -butylperoxybenzoate	Direct electron transfer	0.5–20 $\mu$ M hydrogen peroxide	–0.025 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[100, 113]
HRP (EC 1.11.1.7) (dialysis membrane)	Graphite powder and mineral oil	$Mn^{2+}$	1,2-naphthoquinone	1–10 $\mu$ M $Mn^{2+}$	–0.1 V (vs. Ag/AgCl) (7.0)	[125]
HRP (EC 1.11.1.7)	Heat-treated graphite powder and paraffin oil, heat-treated graphite powder and silicon oil, heat-treated graphite powder and phenylmethylsilicon oil (also carbodiimide-activated heat-treated graphite powder and glutaraldehyde)	Hydrogen peroxide	Direct electron transfer	1–80 $\mu$ M	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (5)	[117]
HRP (EC 1.11.1.7)	Graphite powder and mineral oil	Hydrogen peroxide	Direct electron transfer, ferrocene in paste	–	–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[121]
HRP (EC 1.11.1.7)	Graphite powder, EDTA, and mineral oil (coated with Nafion)	Hydrogen peroxide, 2-butanone peroxide, peracetic acid (removal of interference from $Ni^{2+}$ , $Co^{2+}$ , and $Mn^{2+}$ )	Ferrocyanide	No inhibition of the response to the peroxide is caused by the presence of $1 \times 10^{-4}$ M $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , or $Mn^{2+}$	–0.05 V (vs. Ag/AgCl) (8.8)	[156]
HRP (EC 1.11.1.7)	Heat-activated carbodiimide-activated graphite powder, graphite powder, and granular Teflon	Hydrogen peroxide, 2-butanone peroxide	Ferrocene	20–200 $\mu$ M hydrogen peroxide	0.0 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[157]
Pyruvate oxidase (EC 1.2.3.3)	Graphite powder and paraffin oil	Pyruvate (phosphate)	Methylene green	20–100 $\mu$ M pyruvate	+0.2 V (vs. SCE) (7.0)	[123]
Sulfite oxidase (EC 1.3.1.1) (crosslinked on agarose gel with 1,1'-carbonyldiimidazole and mixed with paste)	Graphite powder and light mineral oil	Sulfite	Ferrocyanide (in solution)	1–10 $\mu$ M	+0.6 V (vs. Ag/AgCl) (7.5)	[99]
Tyrosinase (EC 1.14.18.1)	Graphite powder, light mineral oil, and poly(4-vinylpyridine)	Phenol	Ferrocyanide	14 ppb–2.5 ppm phenol	–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.5)	[86]
Tyrosinase	Silicon grease to mix coated in solid graphite	Dopamine, epinephrine, phenol	–	6 $\mu$ M–5 mM range (dopamine)	–0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[87, 97]

Electroanalysis, 1998, 7, No. 1

## WIRELESS CARBON FIBRE ELECTRODES

33

Table 1. Continued.

Enzyme	Composition of paste	Substrate	Mediator/catalyst	Linear range	$E_{app}$ (pH)	Ref.
Tyrosinase (EC 1.10.3.1)	Graphite spore paste (Dylon)	Dopamine, catechol			-0.2 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[92]
Tyrosinase (mushroom)	Platinized graphite powder and mineral oil	Removal of aminaminophen		Up to ~95% removal of 0.1 mM aminaminophen	+0.6 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[141]
Tyrosinase (mushroom) (EC 1.14.18.1)	Ruthenium on carbon (or rhodium on carbon, palladium on carbon), mineral oil, and octadecylamine	Phenol, catechol, dopamine, <i>p</i> -methoxyphenol, 3-chlorophenol		3.8–80 $\mu$ M phenol 3–80 $\mu$ M 1-chlorophenol 1–80 $\mu$ M <i>p</i> -methoxyphenol 0.5–80 $\mu$ M catechol	-0.1 V (vs. Ag/AgCl) (7.4)	[142]
Uricase (EC 1.7.3.3)	Graphite powder and mineral oil	Removal of uric acid		Removal up to 0.1 mM uric acid	(7.4)	[98]
Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22) (dialysis membrane)	Graphite powder and light mineral oil	Xanthine		1–25 $\mu$ M	0 V (vs. SCE) (8.0)	[98]

product [7, 17, 19–22]. In this respect both one- and two-electron acceptors have been carefully studied. It seems as though the best results obtained have been with two-electron acceptors also functioning as proton acceptors [7, 17, 20–22] or the coupling the NAD(P)<sup>+</sup> dependent dehydrogenase system to a second enzymatic step based on diaphorase, an enzyme oxidizing NAD(P)<sup>+</sup> [17, 53, 73, 80, 153]. Carbon pastes [53, 75–77, 85, 91, 109, 118, 120, 130, 133, 134, 139, 144, 155] and in some instances electropolymerized layers formed on conventional electrodes [169] or silk screen printed electrodes [170] seem to be promising candidates for overcoming the obstacles mentioned with these enzyme systems. These configurations allow the simultaneous immobilization of the enzyme, the soluble cofactor, and additionally a mediator or a second enzyme in close proximity to each other to allow the initial electrons to move against the thermodynamic driving force from the enzyme substrate to the cofactor, further to the mediator, and finally to the electrode. Such a reaction sequence making use of a mediator is outlined in Figure 2 illustrating the flow of electrons for a system where the  $E^0$  value of the substrate/product is more positive than that of NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H.

## 3. Oxidases

All oxidases depend on a cofactor strongly bound within the enzyme structure. The structure of the redox cofactor is either of flavin type (FAD or FMN) [7] or a copper ion containing group, the exact structure of which for all enzymes has not been fully elucidated yet [167, 168]. The enzyme may also contain additional metal ions (e.g., Fe or Mo), the function of which is unclear. All oxidases make use of molecular oxygen as the

reoxidation agent in the catalytic cycle. Depending on the enzyme's ability to donate two or four electron to molecular oxygen, either hydrogen peroxide or water is the final product. Due to the high oxidation power of molecular oxygen, all oxidase-catalyzed reactions can be regarded as chemically irreversible when using its natural electron acceptor. The  $E^0$  of the enzyme bound cofactor is most likely to shift somewhat compared with its value when free in solution. For example, FAD bound to glucose oxidase (*Aspergillus niger*) has an  $E^0$  value at pH 7.0 of -0.41 V vs. SCE [171] as opposed to free dissolved FAD having a value of -0.461 V at pH 7.0 [172]. An oxidation reaction catalyzed by an oxidase is depicted in Figure 3. Many of the oxidases are substantially glycosylated, e.g., native glucose oxidase from *Aspergillus niger* having a saccharide content of about 16% [173, 174]. As is easily realized from Figure 3, an oxidase-based reaction can be electrochemically followed either by the decreased oxygen content in the solution at a Clark type oxygen electrode as was done in the very first enzyme electrode [14] or if hydrogen peroxide is the end product, by its direct electrochemical oxidation (or reduction) at the electrode [82, 102, 107, 135, 136, 157, 158, 175, 176]. However, both these ways of following the enzyme reaction are connected with drawbacks. The use of the oxygen electrode is based on the following of a decrease in response current, which is always a drawback. The electrochemical reduction of oxygen calls for a membrane covered electrode (Clark type) to prevent interfering reactions to occur at the electrode surface largely decreasing its sensitivity and a substantial negative electrode potential ( $\approx -0.6$  V vs. Ag/AgCl) is needed leading to a noisy background current. Electrochemical oxidation of the hydrogen peroxide produced occurs at high overvoltages ( $\approx +0.6$  V–0.7 V vs. Ag/AgCl, pH 7) at metal and at even higher potentials at carbonaceous electrodes (+0.9–

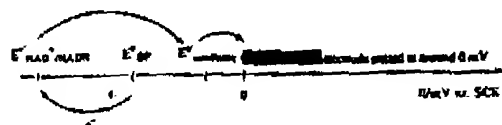


Fig. 2. Charge transfer reaction for an oxidation reaction catalyzed by an NAD<sup>+</sup> dependent dehydrogenase, where the  $E^0$  of the substrate/product is more positive than that of the NAD<sup>+</sup>/NADH, coupled to a redox mediated electrochemical reoxidation of NADH.

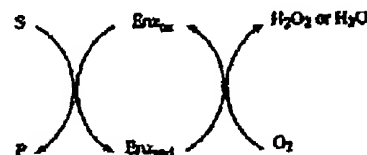


Fig. 3. Reaction sequence for an oxidation reaction catalyzed by an oxidase using molecular oxygen as electron-proton acceptor.

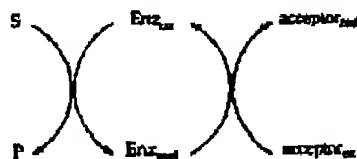


Fig. 4. Reaction sequence for an oxidation reaction catalyzed by an oxidase using an artificial electron acceptor.

1.15 V). Quite sensitive detection systems can be constructed through this detection principle. However, the restricted solubility of oxygen in the solution may limit the enzyme reaction and the necessary high potential opens up the detection system for a variety of interfering reactions mainly for easily oxidizable species such as ascorbate, urate, paracetamol, and neurotransmitters common in clinical samples.

Much work has therefore been carried out trying to decrease the applied potential for oxidase-based detection. One way is to try to obtain direct electron transfer reactions between oxidases and electrodes [17, 18, 127, 164]. However, as opposed to some flavo- and PQQ-enzymes belonging to the class of dehydrogenases, it seems as though the active site is buried deep inside the enzyme in an insulated pocket not allowing an efficient electron tunneling to an electrode. Most oxidases thus seem to be intrinsic as opposed to extrinsic enzymes not allowing direct electron transfer reactions between the bound cofactor and an electrode [16]. Many oxidases readily react with artificial mediators [7], which can be used to shuttle the electrons from the reduced form of the enzyme to an electrode as illustrated in Figure 4. Similar to the dehydrogenases with bound cofactors and contrary to the reduced forms of the nicotinamide type cofactor, both one and two electron acceptor type mediators have high reaction rates with these enzymes [7]. However, there is no general mediator working efficiently with all oxidases. A major break-through using artificial mediators in enzyme-based biosensors was the work by Cass *et al.* [177], who used various ferrocene derivatives localized on graphite foil to shuttle electrons from glucose oxidase covalently bound to the electrode.

#### 4. Peroxidases

Peroxidases have been used for a long time for the determination of hydrogen peroxide and small organic peroxides.

The use of peroxidases in combination with hydrogen peroxide producing oxidases is also well established in analytical chemistry both in spectrophotometric and electrochemical detection. Peroxidases are generally small often glycosylated redox enzymes with protoporphyrin IX (or a closely related structure) as the strongly bound cofactor. They are all active for the reduction of hydrogen peroxide and structurally related small organic peroxides. In the reaction with peroxide the native form of the enzyme becomes oxidized in a single two electron step into a state usually denoted compound-I. The rereduction back to the native form occurs in two single one electron steps with an intermediate form denoted compound-II. Depending on the peroxidase enzyme a number of different compounds may work as electron donors. With the most commonly used peroxidase, horseradish peroxidase (HRP), virtually any reducing agent may work in this respect, e.g., ferrocyanide, phenol, *ortho*- and *para*-phenylenediamines, iodide, ascorbate, etc. The oxidized reaction product can in turn be electrochemically reduced at an applied potential substantially lower compared with that of the direct oxidation of hydrogen peroxide. Peroxidase-modified carbon paste electrodes have therefore been used for the determination of hydrogen peroxide and organic peroxides with the use of soluble or immobilized electron donors acting as mediators. Examples of such mediators are *o*-phenylenediamine [115, 128], ferrocyanide [92, 156], and ferrocene [112, 121, 157]. Peroxidase-based carbon pastes, have also been used in mediatorless fashion and together with hydrogen peroxide producing oxidases, see Tables 1 and 3 and below. The reaction sequence for such a coupling is illustrated in Figure 5.

Figure 6 is included to illustrate where on the potential scale the approximate  $E^0$  values are found of the various groups of redox enzymes most commonly used in conjunction with carbon paste electrodes. The  $E^0$  value of glucose/glucoselactone is also included for comparison as well as the potential range offering the most sensitive and interference-free detection.

##### 4.1. Mediatorless Electron Transfer Reaction Between Redox Enzymes and Carbon Paste Electrodes

Recently an increasing number of articles have reported amperometric enzyme sensors based on mediatorless electrodes where a direct electric communication between the active site of the enzyme and the electrodes results in appreciable current densities in the presence of the enzyme substrate. Normally, an oxidase such as glucose oxidase has not been reported to reveal high current densities in the presence of glucose when

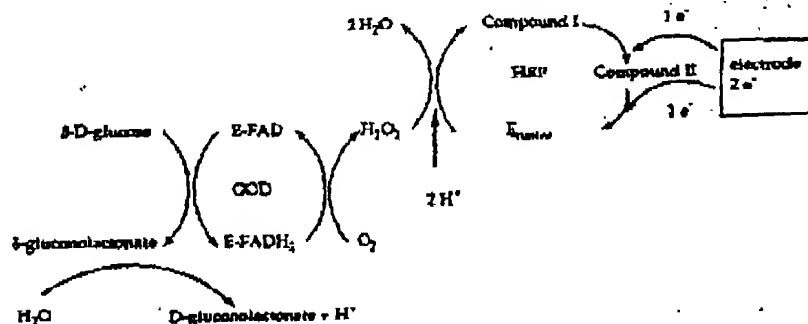


Fig. 5. Reaction sequence for an oxidation reaction catalyzed by a hydrogen peroxide producing enzyme (glucose oxidase, GOD) coupled to electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide catalyzed by a peroxidase (HRP).

Electroanalysis, 1995, 7, No. 1

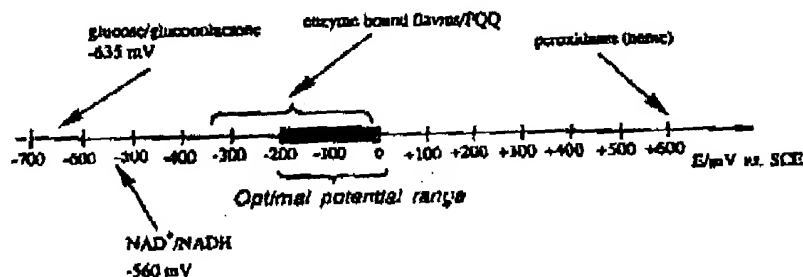


Fig. 6. Potential scale with optimal potential range for amperometric biosensing.

the enzyme is attached to an electrode poised at a potential close to that of the  $E^0$  of the enzyme. However, Koopal and co-workers describe glucose sensors in a series of papers [179, 180] based on the immobilization of glucose oxidase within electropolymerized polypyrrole operating close to the  $E^0$  of GOD. Yabuki *et al.* [127, 164] have obtained similar results by reacting glucose oxidase with a poly(ethylene glycol) (PEG) derivative. PEG-GOD was able to communicate directly with the conducting material when immobilized into carbon pastes.

However, mainly enzymes from other groups have been reported to communicate with electrodes in a mediatorless fashion. Recent papers by Guo and Hill [16] and Ikeda [17] summarize the latest achievement in this area. It seems as though especially redox enzymes incorporating a heme group tend to communicate directly with electrodes. A range of different mediatorless sensors for hydrogen peroxide and organic peroxides based on immobilized peroxidases in carbon paste and graphite epoxy resin electrodes have been described [20, 75, 76, 100, 113, 117, 121, 129, 146–148]. Recently, Ikeda and co-workers [17] have focused on sensors based on adsorbing flavin- and PQQ-enzymes also having a heme-group within the structure on carbon paste electrodes. They showed that a direct electron transfer is possible and give examples of sensors for NAD(P)H based on diaphorase [73], fructose based on fructose dehydrogenase [63], and D-glucose based on D-glucose dehydrogenase [50].

## 5. Substrate Sensors Based on Enzyme-modified Carbon Pastes

### 5.1. Sensors for Saccharides

The most studied enzyme in enzyme-modified carbon paste electrodes is, as might be expected, glucose oxidase (GOD). The reason is of course the great interest in making sensors for glucose, especially important in the medical/clinical area as a tool for diabetes patients. The enzyme lends itself suitable to biosensor studies [173, 174] being a robust enzyme 'withstanding abuse by students and physical chemists' [18].

All glucose sensors based on enzyme-modified carbon pastes and epoxy resins are listed in Table 1. As mentioned above, GOD was the first enzyme to be mixed into carbon paste consisting of graphite powder and silicon oil [82]. The GOD-carbon paste electrode was used in a flow injection system. The detection was based on the direct electrochemical oxidation on the hydrogen peroxide produced at an applied potential of +0.9 V (vs. Ag/AgCl) (pH 6.5). The linear response range was

between 0.5 and 30 mM glucose. A similar approach was reported by Asnine *et al.* [107] and Wang *et al.* [90] having to apply about +0.9 to +1.1 V to follow the reaction. Other attempts have been its incorporation into graphite epoxy resins and the use of the enzyme's natural electron acceptor. Without any catalyst the necessary applied potential for oxidation of hydrogen peroxide was, however, very high, +1.15 V (vs. Ag/AgCl) [135]. Linear calibration between 10  $\mu$ M and 30 mM was registered. By the addition of a mixture of gold and palladium powders the potential could be decreased to +0.9 V [136]. Wang and Naser reported on adding fumed silica to a paste consisting of graphite powder and mineral oil to reduce the overvoltage for electrochemical oxidation of hydrogen peroxide [158]. Wang *et al.* [140] also reported on the use of a paste consisting of ruthenium-dispersed graphite powder and mineral oil for which the electrochemical reduction of hydrogen peroxide could be monitored at -0.15 V allowing very sensitive and selective detection of glucose. Another way is to co-immobilize GOD with HRP in carbon paste also allowing detection below 0 V either due to the use of a mediator for HRP [97, 101] or the mediatorless reduction of HRP on the graphite in the paste [117]. However, most GOD-modified carbon paste electrodes report on the use of an artificial mediator, see Table 1. A series of different artificial mediators known to work with GOD in solution [7] have been admixed with carbon paste either with GOD immobilized on the mediator modified paste or having GOD also in the paste, see Table 1. Examples of mediators are ferrocene and monomeric or polymeric derivatives thereof [54, 60, 84, 89, 90, 95–97, 103, 105, 107, 108, 111, 114–116, 119, 126, 131, 132, 138, 158], benzoquinone or benzoquinone containing polymers [17, 41–43, 159, 163, 181, 182], tetrakis(hydroquinone) (THQ) [37, 38, 60], tetracyanoquinodimethane (TCNQ) [122], TTF-TCNQ conducting salt [79], cobalt phthalocyanine [137], Meldola blue [161], methylene green [162], and 1-(N,N-dimethylamino)-4-(4-morpholine)benzene [160]. By the use of such mediators, the necessary applied potential has been substantially decreased. The use of mediators, however, does not necessarily mean that the risk for interfering reactions is eliminated as the mediators may also catalyze the electrooxidation of interferants. Only the polymer bound viologen type mediators and Meldola blue allow detection below 0 V. A special case is where GOD was reacted with activated poly(ethylene glycol) (PEG) [114, 115, 119, 127, 164]. The PEG activated GOD was shown to be soluble in organics and retained higher activity in the paste compared with native GOD resulting in higher response currents and prolonged stability [114, 115, 119].

Even though more than 1200 articles have appeared on GOD-based amperometric biosensors, not all problems have been



solved in detecting glucose. Therefore it is natural that attempts to make glucose sensors based on other glucose oxidizing enzymes have appeared. There are essentially two other rather glucose selective redox enzymes to choose between,  $\text{NAD}^+$ -dependent glucose dehydrogenase (GDH) and PQQ-dependent glucose dehydrogenase (GDH-PQQ). GDH was first reported being used in carbon paste in 1991 [109], where the enzyme as well as the necessary cofactor and an aqueous soluble monomeric redox mediator were mixed into the paste. The mediator allowed the sensing at around 0 mV (vs. SCE). However, to prevent the aqueous soluble compounds from leaching out into the contacting solution the electrode surface was necessarily covered with a membrane. Further progress was made using a polymer bound mediator instead [128, 134]. GDH-PQQ has only in one instance been coupled to carbon paste electrodes [17] and only on the surface. GDH-PQQ is an interesting enzyme as its reaction cycle is insensitive to molecular oxygen, it has a bound cofactor, and has a turn-over number with glucose much higher than that of GOD. However, its reported lack of stability has restricted its practical use.

Galactose oxidase is a copper containing and hydrogen peroxide producing oxidase having a rather broad selectivity including galactose and some other saccharides as well as some related substances such as some primary alcohols [188]. This enzyme has only been reported in one instance as being used in conjunction with carbon paste electrodes [45]. The enzyme was adsorbed on the surface of a carbon paste modified with 1,1'-dimethylferrocene.

Fructose is another important saccharide, for which fructose dehydrogenase (FDH) is the only reported oxidizing enzyme. FDH is a membrane bound enzyme containing PQQ as the bound cofactor and has additionally a heme group attached. It is reported to function only on the surface of carbon pastes and only with the addition of a surfactant such as Triton-X 100 to the contacting buffer [17, 36, 65, 75]. One attempt to mix the enzyme into carbon paste totally failed and no activity for fructose could be obtained [75]. Reduced FDH readily reacts with a number of artificial mediators and BQ has been used as a modifier in carbon paste to act as electron acceptor-mediator. However, as has been argued [17], as the enzyme contains an additional heme group, direct mediatorless electron transfer should be possible between the enzyme's active site and the electrode and has been shown to occur between -0.1 and +0.5 V (vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) depending on the treatment of the graphite powder used in the paste [17, 65, 75].

Aldose dehydrogenases (ADH) is another PQQ dependent membrane bound enzyme, however, lacking an additional heme group in contrast to FDH. It is active for a whole range of different aldoses such as glucose, xylose, mannose, and galactose. In contrast to other glucose oxidizing enzymes (GOD, GDH, and GDH-PQQ) ADH seems to be equally active for both the two predominant anomeric configurations of glucose in aqueous solution (the  $\beta$ - and  $\alpha$ -pyranose forms). Similar to other PQQ-containing dehydrogenases, reduced ADH reacts with a whole range of artificial mediators such as ferrocenes and quinones. Successful immobilization of this enzyme was reported only on the surface of carbon paste. When mixed into the paste much less response to glucose was obtained compared with having the enzyme adsorbed on the surface [76, 81]. In the absence of a mediator in the paste, some mediatorless response to glucose could be obtained.

Oligosaccharide dehydrogenase (ODH) is similar to ADH an enzyme with a broad selectivity. Xylose, glucose, galactose, mannose, fructose, maltose and higher maltosaccharides can be oxidized with this enzyme. ODH contains a bound cofactor and

reacts with different artificial mediators. It has been immobilized on BQ containing carbon pastes and used for detection of its substrates as well as of the activity of  $\alpha$ -amylase in serum [17, 52, 55, 61].

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is an  $\text{NAD}^+$  dependent enzyme and as such needs the addition of its cofactor. By co-immobilizing it with diaphorase on the surface of carbon paste also containing  $\text{NAD}^+$  and vitamin  $\text{K}_3$  (mediator for diaphorase) a sensor for glucose-6-phosphate could be constructed [53]. The sensor could also be used for very sensitive monitoring of  $\text{NAD}^+$  and NADH through amplification recycling at the electrode surface [63].

Sensors for D-glucosate have been studied based on D-glucosate dehydrogenase, an enzyme with bound cofactor, adsorbed on mediator modified (BQ or ubiquinone) pastes [17, 46, 48] and also on plain pastes as direct electron transfer was shown possible reflecting that it also incorporates an additional heme group [17, 48].

## 5.2. Sensors for Acetylcholine

Choline oxidase is an important enzyme that has been intensively used together with primarily acetylcholine esterase but also with butyrylcholinesterase for enzymatic determination of the neurotransmitter acetylcholine [183]. Acetylcholine esterase and choline oxidase have been co-immobilized by mixing into carbon pastes, either using monomeric TTF [104] or flexible ferrocene polymers allowing contact with the active site of choline oxidase [116, 143]. Various attempts have been tried previously to co-immobilize these two enzymes primarily on inert inorganic supports for use in enzyme reactors. However, it seems as though the use of any of the most commonly used covalent binding reagents for co-immobilizing both enzymes fail to result in retained activity of both enzymes. Contrary to this, both enzymes seem to thrive in carbon paste.

## 5.3. Sensors for Alcohols

Sensors for various alcohols have been constructed based on  $\text{NAD}^+$ -dependent yeast alcohol dehydrogenase (ADH), PQQ-dependent alcohol dehydrogenase (ADH-PQQ), or alcohol oxidase. Senda *et al.* [44] mixed  $\text{NAD}^+$  into the paste having ADH adsorbed on the surface of the paste electrode covered by a dialysis membrane. Billerwaki and Schmidt [85] mixed both the cofactor and ADH into the paste and the resulting electrode showed activity for ethanol, 1-propanol, 2-propanol, and 1-butanol. Wang *et al.* [120] showed that ADH could be co-immobilized with the cofactor into graphite epoxy resin with retained enzymatic activity for ethanol, allyl alcohol, 1-propanol, 2-propanol, and 1-butanol. In these cases detection was based on the direct oxidation of the NADH produced at a rather high applied potential, +0.7 V vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ . A difference in selectivity for ADH was noted when immobilized in the organic phase electrode compared with its selectivity pattern in aqueous solution. By using ruthenium activated carbon in carbon paste Wang *et al.* [139] could decrease the applied potential to +0.6 V for the same system. In another paper from Wang's group [155] a carbon paste electrode (graphite powder and mineral oil) was reported where except for ADH and  $\text{NAD}^+$  also fumed silica was added. The added fumed silica had several beneficial properties such as lowering the necessary applied potential for NADH oxidation, drastically increasing the response current, and strongly retaining the enzyme and cofactor in the paste. Addition of fumed silica has also been

## Modified Carbon Paste Electrodes

37

shows to decrease the overpotential for electrochemical oxidation of hydrogen peroxide [158], see above. By the use of phenoxazine (monomeric) or phenothiazine type (polymeric) mediators for catalytic NADH oxidation added to carbon paste, Gorton *et al.* [75, 91, 110], Dominguez *et al.* [77, 130], and Chi *et al.* [144] showed that the applied potential could be drastically decreased to occur around 0 V. The close coupling between all reactions in the sequence (enzymatic, mediated, and electrochemical), see Figure 2, drives the enzymatic reaction towards the product side allowing the system to operate at neutral pH resulting in straight calibration plots for ethanol up to the millimolar level.

ADH-PQQ has also been used for enzymic electrode constructions. However, similar to all other PQQ-dependent dehydrogenases, no single report has appeared yet with a successful immobilization of such an enzyme directly in an organic paste or epoxy resin (see above for fructose- and aldose PQQ-dehydrogenase). ADH-PQQ was reported to be immobilized on carbon pastes modified with a number of different mediators [17]. The reaction with different alcohols including methanol and ADH-PQQ could be mediated with various 1- and 2-electron acceptors, such as BQ, NMP<sup>+</sup>, 1-methoxy NMP<sup>+</sup>, DCPIP, and ferripyridine, as shown previously for other PQQ-dehydrogenases [7].

Alcohol oxidase (AOD) can be obtained from a variety of different yeasts such as *Candida*, *Pichia*, and *Hansenula* [184]. All AODs show a relatively broad selectivity not only to aliphatic alcohols including methanol but also to a whole range of small organic compounds of similar structure containing hydroxyl groups. Various attempts to find artificial mediators to work with AOD has failed [185]. The stability of the enzyme either in solution or when immobilized on an inert support and used in an aqueous phase is very restricted [185–189]. AODs from both *Candida boidinii* and *Pichia pastoris* have been successfully co-immobilized with HRP in carbon pastes using different noncovalent and covalent immobilizing procedures [76, 117, 129, 145, 146, 149–151, 190]. The selectivity of AOD from *Candida boidinii* was also shown to change its reported selectivity [191] to include 2-propanol, for which it should not be active, with a response equal to that of 1-propanol when immobilized in carbon paste [146].

For glycerol determinations two different glycerol dehydrogenases have been used, one NAD<sup>+</sup> dependent [53] and another with bound flavin cofactor [17, 51]. Co-immobilizing the NAD<sup>+</sup> dependent glycerol dehydrogenase with diaphorase on NAD<sup>+</sup> and vitamin K<sub>3</sub> (mediator for diaphorase) containing carbon pastes allowed detection of glycerol at a low overvoltage. Flavoprotein glycerol dehydrogenase was also immobilized on mediator containing pastes, see Table 2. A number of different mediators could be used.

## 5.4. Sensors for Amino Acids

D- and L-amino acid oxidases (DAAOD and LAAOD, respectively) are two enzymes that each have a broad selectivity but an absolute stereoselective specificity. LAAOD is active with some artificial mediators, whereas DAAOD seems to be much more fastidious in its choice of electron acceptor [7]. LAAOD was one of the very first enzymes to be immobilized on the surface of a mediator modified carbon paste and used for detection of L-leucine [45]. Both enzymes have been successfully co-immobilized with different peroxidases (HRP and AHP) in carbon pastes [76, 129, 147, 148, 150]. Contrary to the case with co-immobilized AOD and HRP any attempt to use covalent

immobilization reagents in the immobilization procedure failed. However, the addition to the paste of various polyelectrolytes considerably improved the sensor performance. A drastic change in the selectivity patterns of both enzymes was noticed compared with their aqueous solution recognition patterns [147, 148]. Especially for LAAOD, which lacks appreciable turn-over numbers for about 10 of the most common L-amino acids in aqueous solution, a dramatic change was noticed, so that when contained in carbon paste all of the most common 20 amino acids were oxidized at high rates [148].

L-Glutamate dehydrogenase and L-glutamate oxidase are examples of redox enzymes with a much higher specificity than the amino acid oxidases. L-Glutamate is an important amino acid to be analyzed in clinical and food samples. Incorporation of L-glutamate dehydrogenase into octadecylamine-treated carbon pastes was shown to stabilize the fragile enzyme [118, 133]. The necessary cofactor and mediators for catalytic NADH oxidation were added to the contacting solution. L-Glutamate oxidase could be immobilized on TTF containing carbon paste [78] or into carbon pastes either containing flexible ferrocene siloxane- or ethylene oxide polymers mediating the electron transfer from the reduced enzyme [116] or HRP catalyzing the electroreduction of the hydrogen peroxide produced in the presence of the natural electron acceptor L-L-glutamate oxidase [75, 76].

## 5.5. Sensors for Glycolate

Glycolate oxidase was one of the very first enzymes to be immobilized on the surface of a mediator (1,1'-dimethylferrocene) modified carbon paste electrode [43]. It was also shown to function in carbon paste with flexible ferrocene containing polymers [93, 96] for glycolate sensing in the millimolar range.

## 5.6. Sensors for L-Lactate and Pyruvate

After glucose, L-lactate has been one of the most studied substrates for enzyme-based amperometric sensors. L-Lactate is an intermediate in carbohydrate metabolism and as such can be used as a relevant indicator of metabolic control and malfunction in clinical chemistry. In the dairy and food industry its determination is also of importance. There are mainly five redox enzymes active for this compound, i.e., L-lactate dehydrogenase (LDH, NAD<sup>+</sup> dependent), L-lactate PQQ-dehydrogenase, cytochrome b<sub>5</sub>, L-lactate oxidase (LOD), and L-lactate monooxygenase (an oxygenase having a bound cofactor). All catalyze the oxidation of L-lactate into pyruvate, except L-lactate monooxygenase for which the products are acetate and CO<sub>2</sub>. LDH, LOD, and L-lactate monooxygenase have been used as pure enzyme preparations in combination with carbon paste electrodes. Cytochrome b<sub>5</sub> rich yeast cells have been used also, see below under tissue-based sensors.

Reflecting the importance of L-lactate determinations, LDH was one of the first two enzymes studied in combination with a carbon paste electrode modified with NAD<sup>+</sup> [39]. As the  $\Delta^0$  of the L-lactate/pyruvate redox couple is higher than that of NAD<sup>+</sup>/NADH, the enzymatic oxidation of L-lactate with LDH necessarily needs a second following reaction in close proximity to the LDH reaction to push the equilibrium of the enzyme reaction to the product side. Miki *et al.* [53] co-immobilized LDH and diaphorase on the surface of vitamin K<sub>3</sub> modified carbon paste and Gorton *et al.* [76] immobilized LDH in a polymer mediator-modified paste so that the NADH could be electrocatalytically oxidized circumventing the drawbacks of

Electroanalysis 1996, 7, No. 1

direct electrochemical NADH oxidation. Wang *et al.* [155] recently reported on the addition of fumed silica to LDH and NAD<sup>+</sup>-modified carbon paste as a means of increasing the rate of electrochemical oxidation of the NADH produced. LOD has been mixed into mediator modified carbon pastes [124, 154] working at around +0.4 to +0.5 V (vs. SCE) or co-immobilized with peroxidase also in paste electrodes [75] operating at -0.05 V (vs. Ag/AgCl). L-Lactate monooxygenase in paste electrodes was shown to react with flexible ferrocene polymers around +0.3 V (vs. SCE) [96].

Pyruvate oxidase can be used both for pyruvate and phosphate determinations as the enzyme needs phosphate in the reaction. For activity, pyruvate oxidase needs additionally the presence of thiamine pyrophosphate and Ca<sup>2+</sup> ions. When immobilized into methylene green (mediator) modified carbon paste, pyruvate oxidase could be used at +0.2 V (vs. SCE) for both pyruvate and phosphate determinations in the submillimolar range [123].

### 5.7 Sensors for Peroxides

There are many peroxidases available, however, only HRP and fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* (ARP) have been used so far in combination with carbon paste and graphite epoxy electrodes for sensing of hydrogen peroxide, organic peroxides [20, 92, 100, 112, 113, 117, 121, 156, 157], or in combination with a hydrogen peroxide producing oxidase (see above). Various mediators have been used, in solution as well as in the paste, to catalyze the electron transfer from the electrode to the oxidized states of the enzyme, see the tables. Efficient mediatorless electron transfer to the enzyme is also possible as stated above.

Under certain conditions peroxidases can participate in the aerobic oxidation of hydrogen donors through molecular oxygen. This activity is stimulated by the presence of, e.g., Mn<sup>2+</sup>. Thus HRP-modified carbon paste also incorporating naphthoquinone as hydrogen donor could be used for sensitive detection of Mn<sup>2+</sup> in the micromolar range [125].

### 5.8. Sensors for Phenolics and Hydroquinones

Also a number of water-producing oxidases have been used for the construction of carbon paste-based amperometric biosensors. Especially the phenol oxidizing enzyme tyrosinase [71, 86, 87, 92, 97, 141, 142] seems to have been of interest, see also section 8. Tyrosinase is a copper-containing enzyme which in a first step oxidizes monophenolic substances in the presence of molecular oxygen; half of the molecule is introduced into the phenol thus forming a catecholic compound, which in turn is further oxidized to form its *ortho*-quinone counterpart. This second oxidation step is also oxygen dependent. Here oxygen acts as an electron acceptor and water is produced. The *ortho*-quinone is electrochemically active and can be used efficiently

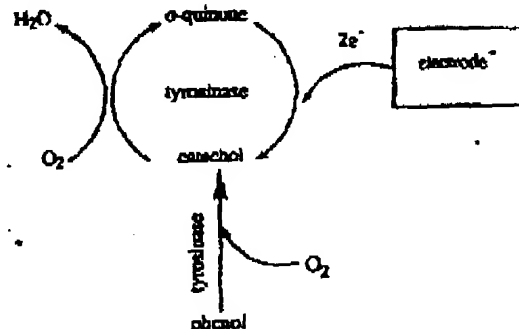


Fig. 7. Reaction sequence for enzymatic oxidation of phenol and catechol by tyrosinase and its coupling to an electrochemical transducer

binding to poly(4-vinylpyridine), this drawback could be circumvented [86]. Due to the enzyme's broad selectivity, tyrosinase-based sensors have been used for the monitoring of a whole series of monophenolic and catecholic compounds, such as phenol, 3-chlorophenol, 4-chlorophenol, 4-methoxyphenol, dopamine, 4-cresol, pyrogallol, L-tyrosine, tyramine, 3,4-dihydroxyphenylalanine, and chlorogenic acid.

### 5.9. Sensors Based on Other Oxidases

Xanthine and hypoxanthine are degradation products of nucleic acids and are as such important compounds to be determined as indicators of food freshness (meat and fish). They can be monitored through the enzymatic oxidation by xanthine oxidase leading to the production of hydrogen peroxide and urate. Xanthine oxidase can be immobilized both on [62, 66, 68, 69] and in [88] carbon pastes. The reaction can be followed by electrochemical oxidation of the urate formed, which is electrochemically active at rather low potentials ( $\approx +0.4$  V vs. Ag/AgCl) [66, 68], or through the radical superoxide formed at much less positive applied potentials ( $\approx 0$  V) [62, 88]. The reaction can also be mediated through the use of mediators enabling monitoring at +0.3 V [69]. As the enzyme is inhibited by, e.g., allopurinol, a sensor based on this enzyme can also be used for its quantification through its inhibiting action on the conversion of xanthine or hypoxanthine [62].

Sulfite was monitored in the micromolar range through the use of a carbon paste electrode, into which sulfite oxidase covalently immobilized on agarose gel was mixed [99]. Ferrocyanide in solution was used as mediator. Another carbon paste electrode modified with 1,1'-dimethylferrocene having carbon monoxide acceptor reductase adsorbed on its surface could be used for monitoring CO in the micromolar